

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía Patológica



**ANÁLISIS DE BIOMARCADORES EN EL CARCINOMA
DE MAMA: EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA Y
VALOR PRONÓSTICO**

TESIS DOCTORAL

DOCTORANDA: ANGELA BIBIANA ORTIZ OTERO

Directores de tesis: Dra. Carmen Bellas Menéndez

Dra. Paloma Martín Acosta

2014

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, por los esfuerzos y sacrificios realizados durante el proceso de realización de mi tesis doctoral. El apoyo incondicional que siempre he obtenido de mis padres y hermanos, de quienes he aprendido a ser una persona trabajadora, responsable y comprometida. El camino del amor siempre me ha llevado a cumplir mis metas y cada día y noche de trabajo fueron ellos mi motivación y mi voz de aliento, les amo. Sin ellos no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

Muy especialmente a la Doctora Carmen Bellas Menéndez y a la Doctora Paloma Martín Acosta, directoras de mi tesis, quienes me permitieron tener las condiciones ideales de trabajo, estuvieron a mi lado durante la realización del trabajo de campo y me brindaron nuevos caminos de aprendizaje que han afianzado mi formación como patóloga y doctoranda. Ha sido un honor trabajar a su lado y contar con la guía de excelentes profesionales de la salud e investigación.

A todo el equipo técnico del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda. Increíbles personas e inigualables profesionales. Sin su trabajo e interés de cooperación con mi proyecto, hubiera sido imposible la realización de este estudio. Además, quiero agradecer especialmente a Diego García, Yolanda Vicente, Oceanía Martín y Linah Kilany, técnicos del laboratorio de Patología Molecular y del laboratorio de Patología Quirúrgica General. No tengo forma de expresar mi enorme agradecimiento, saben por la estrecha relación que mantenemos lo importante que ha sido para mi contar con ustedes en los arduos días de trabajo, Gracias!

Finalmente a mis amigos quienes son mi pequeña familia en España y conocen más que nadie el esfuerzo y los sacrificios que tenido que hacer durante este periodo formativo. La amistad me ha brindado una casa, una cama, un hogar y la posibilidad de continuar con el estudio, sobretodo el cariño y la buena voluntad de Margarita, Kelly y Santiago, han permitido la finalización de este proyecto.

*A mi familia quienes son mi motor de vida,
en especial a mis dos princesas:
Laurita y Majo*

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL CARCINOMA DE MAMA	13
1.1.1. Tipo histológico	13
1.1.2. Grado histológico	16
1.1.3. Estadificación tumoral	17
1.2. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA DE MAMA	19
1.3. RECEPTORES HORMONALES	26
1.3.1. Receptor de estrógenos (RE)	26
1.3.2. Receptor de progesterona (RP)	29
1.3.3. Receptor de andrógenos (RA)	30
1.4. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO HUMANO 2 (HER2)	32
1.5. MARCADORES DE PROLIFERACIÓN (Ki67)	33
1.6. PROTEÍNA Bcl2	34
1.7. PROTEÍNA p53	35
1.8. PROTEÍNA CICLINA D1 (CCND1)	35
1.9. PROTEÍNAS DEL CICLO CELULAR	36
1.10. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	41
1.10.1. GATA3	41
1.10.2. FOXA1	42
1.11. OTROS MARCADORES	43
1.11.1. GCDP-15	43
1.11.2. Aurora Kinasa A (AURKA)	43
1.11.3. GDF15	44
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
2.1. HIPÓTESIS	49
2.2. OBJETIVOS	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1. SELECCIÓN DE CASOS Y RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	53
3.2. CONSTRUCCIÓN DE MATRICES DE TEJIDO (TMA)	54
3.3. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	54
3.4. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	60
3.4.1. Valoración de la hibridación <i>in situ</i>	62
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
4. RESULTADOS	65
4.1. RESULTADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	67
4.2. RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	68
4.3. RESULTADOS DEL FISH	75
4.4. RESULTADOS ESTADÍSTICOS	77
4.4.1. Parámetros clínico-patológicos	77
4.4.2. Subtipos tumorales	83
4.4.3. FISH vs IHQ	87
4.4.4. Marcadores IHQ	90

CCND1	90
Receptor de andrógenos (RA)	91
Proteína p53	93
AURKA	94
Proteína p16:	95
Proteína p21	95
Proteína p27	98
Proteína p63	98
GCDFP-15	100
GDF15	100
Proteína Rb	100
Bcl2	101
GATA3	102
FOXA1	103
4.4.5. Supervivencia Global (SG) y Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE)	104
5. DISCUSIÓN	115
5.1. PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.	118
5.2. BIOMARCADORES	120
5.2.1. Ki67	121
5.2.2. HER2	122
5.2.3. Receptor de andrógenos.....	125
5.2.4. Bcl2.....	126
5.2.5. Proteína p53	127
5.2.6. Proteína retinoblastoma (Rb)	128
5.2.7. Ciclina D1	130
5.2.8. Proteína inhibidora de CDK p16.....	132
5.2.9. Proteína inhibidora de CDK p21	134
5.2.10. Proteína inhibidora de CDK p27	136
5.2.11. FOXA1	137
5.2.12. GATA3	139
5.2.13. AURKA/STK15	141
5.2.14. GCDFP-15	142
5.2.15. GDF15	143
5.2.16. Proteína p63	144
6. CONCLUSIONES	147
7. LISTADO DE ABREVIATURAS	153
8. BIBLIOGRAFÍA	157

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma de mama (CM) es una patología neoplásica compleja y muy heterogénea (Perou *et al*, 1999;Weigelt *et al*, 2010a), con gran impacto epidemiológico mundial debido a que se encuentra dentro de las primeras causas de neoplasias malignas (Cancer Genome Atlas Network, 2012), tiene un alto índice de incidencia global y es la primera causa de muerte asociada a cáncer en las mujeres (Malvezzi *et al*, 2013). El diagnóstico del carcinoma infiltrante de mama (CIM) en estadios tempranos ha aumentado como consecuencia del desarrollo de técnicas de diagnóstico más sensibles y de la instauración de adecuados programas de cribado en poblaciones de riesgo. La detección temprana de la enfermedad ha permitido el uso de tratamientos menos agresivos y con mejor respuesta llevando como resultado al aumento de la supervivencia global de la enfermedad (Bosetti *et al*, 2013;Weigel & Dowsett, 2010).

Los factores pronósticos del CM son heterogéneos y han sido objeto de estudio durante décadas, hoy en día se conoce que están ligados a factores morfológicos y moleculares propios de la neoplasia. Existen factores predictivos clínicos como la edad de presentación de la enfermedad, el sexo y la raza, así como factores histopatológicos que comprenden el subtipo y grado histológico, tamaño tumoral, afectación ganglionar regional, la invasión linfovascular, la expresión de receptores hormonales, el alto índice de proliferación celular (marcadores de proliferación) y la presencia de mutaciones o alteraciones moleculares y del ciclo celular (Cianfrocca & Goldstein, 2004;Esteva & Hortobagyi, 2004;Payne *et al*, 2008).

1.1. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL CARCINOMA DE MAMA

1.1.1. Tipo histológico

El CIM es una neoplasia maligna que se origina de las células del ducto, células del lobulillo mamario y células basales/mioepiteliales propias del tejido mamario. Su presentación morfológica y arquitectural define los criterios histopatológicos utilizados en la clasificación de tumores de la mama de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Lakhani *et al*, 2012), que los dividen en: de tipo no especial (NST – tomado de

sus siglas en inglés: No special type), lobulillar, tubular, medular, apocrino, metaplásico, mucinoso, cribiforme, de células acinares y papilar, entre otros (Tabla 1).

El grupo de los carcinomas ductales infiltrantes (CDI) hoy llamado NST es el más frecuente comprendiendo del 75% al 80% de todos los CIM (Lakhani *et al*, 2012; Rosen P., 2009; Siziopikou, 2013; Weigelt *et al*, 2010b), abarca todo el espectro de edad de presentación de la enfermedad pero su media se encuentra entre los 50 y 60 años. Se considera un diagnóstico de exclusión debido a que para que un tumor sea clasificado como CDI/NST, se requiere no cumplir los criterios morfológicos de ninguno de los otros tipos histológicos de CIM (Weigelt *et al*, 2010b). A pesar de esto, clásicamente se reconocen patrones histológicos comunes pero no patognomónicos de este tipo tumoral. Son tumores compuestos de células epiteliales intermedias o grandes que tienden a agruparse y formar estructuras ductales, tubulares y/o acinares, pueden presentar áreas de necrosis asociadas, pero en general son muy diversos en su forma de presentación morfológica.

El segundo tipo histológico en frecuencia es el carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) que representa hasta el 10% de los CIM (Rakha *et al*, 2013) y es uno de los tipos especiales de CM. Característicamente está formado por células epiteliales de tamaño pequeño a intermedio, con apariencia discohesiva, que pueden tener inclusiones intracitoplasmáticas claras e infiltran el estroma en forma de fila india. Además presentan pérdida de la función de la proteína de adhesión celular E-cadherina. La valoración de la expresión inmunohistoquímica (IHQ) de E-cadherina constituye una ayuda diagnóstica en la determinación del tipo histológico de tumores con rasgos histológicos mixtos y tumores pobremente diferenciados, sin embargo se debe tener en cuenta que una pequeña proporción de carcinomas lobulillares pueden mostrar expresión aberrante de E-cadherina, aunque esta suele ser débil y focal (Dabbs *et al*, 2013). En estos casos se recomienda restringir el diagnóstico a los criterios morfológicos. Clásicamente los carcinomas lobulillares se han asociado a presentación bilateral de la enfermedad.

Tabla 1. Clasificación del CIM según la OMS

CLASIFICACIÓN DEL CIM SEGÚN LA OMS	
TUMORES EPITELIALES	10.4. Carcinoma de células fusiformes
1. CARCINOMA INFILTRANTE DE TIPO NO ESPECIAL, NST	10.5. Carcinoma metaplásico con diferenciación mesenquimal
1.1. Carcinoma pleomórfico	10.5.1. Carcinoma con diferenciación condroide
1.2. Carcinoma con células estromales gigantes similares a los osteoclastos	10.5.2. Carcinoma con diferenciación ósea
1.3. Carcinoma con características coriocarcinomas	10.5.3. Carcinoma con otros tipos de diferenciación mesenquimal
1.4. Carcinoma con características melanocíticas	10.6. Carcinoma metaplásico mixto
2. CARCINOMA LOBULILLAR INFILTRANTE	10.7. Carcinoma mioepitelial
2.1. Carcinoma lobulillar clásico	TIPOS INFRECIENTES
2.2. Carcinoma lobulillar sólido	1. CARCINOMA SECRETOR
2.3. Carcinoma lobulillar alveolar	2. CARCINOMA PAPILAR INFILTRANTE
2.4. Carcinoma lobulillar pleomórfico	3. CARCINOMA DE CÉLULAS ACINARES
2.5. Carcinoma tubulolobulillar	4. CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE
2.6. Carcinoma lobulillar mixto	5. CARCINOMA POLIMORFO
3. CARCINOMA TUBULAR	6. CARCINOMA ONCOCÍTICO
4. CARCINOMA CRIBIFORME	7. CARCINOMA RICO EN LÍPIDOS
5. CARCINOMA MUCINOSO	8. CARCINOMA DE CÉLULAS CLARAS RICAS EN GLUCÓGENO
6. CARCINOMA CON CARACTERÍSTICAS MEDULARES	9. CARCINOMA SEBÁCEO
6.1. Carcinoma medular	10. CARCINOMA CON CARACTERÍSTICAS NEUROENDOCRINAS
6.2. Carcinoma medular atípico	10.1. Tumor neuroendocrino, bien diferenciado
6.3. Carcinoma infiltrante NST con características medulares	10.2. Carcinoma neuroendocrino, pobremente diferenciado (Carcinoma de célula pequeña)
7. CARCINOMA CON DIFERENCIACIÓN APOCRINA	10.3. Carcinoma con diferenciación neuroendocrina
8. CARCINOMA CON DIFERENCIACIÓN DE CÉLULA EN ANILLO DE SELLO	11. TUMORES TIPO GLÁNDULA SALIVAL O ANEJOS CUTÁNEOS
9. CARCINOMA MICROPAPILAR INFILTRANTE	11.1. Cilindroma
10. CARCINOMA METAPLÁSICO DE TIPO NO ESPECIAL	11.2. Hidradenoma de células claras
10.1. Carcinoma adenoescamoso de bajo grado	12. CARCINOMA PAPILAR SÓLIDO INFILTRANTE
10.2. Carcinoma metaplásico similar a la fibromatosis	TUMORES EPITELIALES-MIOEPITELIALES
10.3. Carcinoma de células escamosas	1. CARCINOMA ADENOIDE QUÍSTICO

(Lakhani *et al*, 2012)

Los otros tipos morfológicos de CIM, tienen relativamente baja incidencia, suelen presentarse en grupos de edad que se alejan de la media de edad de presentación de la enfermedad, tienen criterios diagnósticos basados en su morfología característica y algunos de ellos se han relacionado con una mayor presencia de mutaciones asociadas a neoplasias hereditarias (*BRCA1/BRCA2*) u otras alteraciones genéticas características de algunos tipos histológicos (Rosen P., 2009;Lakhani *et al*, 2012).

El valor pronóstico es muy variable entre los diferentes tipos histológicos y parece depender más del grado de diferenciación tumoral, el estadio clínico-patológico en el momento del diagnóstico y la asociación a marcadores hormonales y moleculares que en conjunto son determinantes de las opciones terapéuticas a tomar y del comportamiento biológico de cada caso en particular.

1.1.2. Grado histológico

A la clasificación morfológica se adiciona el grado histológico combinado de Nottingham (modificación de Elstón-Ellis del sistema de clasificación de Scarff-Bloom-Richardson) que tiene en cuenta el grado de formaciones tubulares, el pleomorfismo nuclear y el índice mitótico (cuantificación de mitosis en 10 campos de gran aumento 40x). A cada una de las características valoradas se le adjudica una puntuación de 1 a 3 y la sumatoria de estas puntuaciones (puntuación máxima de 9) se clasifica en tres grados histológicos denominados I, II y III ó bajo, moderado y alto grado respectivamente (Lester *et al*, 2009).

El grado histológico se ha relacionado con el comportamiento biológico intrínseco del tumor, mostrando que a mayor grado, la progresión local y a distancia de la enfermedad es más temprana y su valor pronóstico ha sido reconocido en estudios previos (Anderson *et al*, 2000;Frkovic-Grazio & Bracko, 2002;Rakha *et al*, 2010a). Así mismo, se correlaciona con los subtipos moleculares, observándose que el grupo de tumores con expresión de receptor de estrógenos (RE) y baja expresión de marcadores de proliferación celular presentan mayor proporción de tumores grado I, al contrario que aquellos grupos con comportamiento biológico más agresivo (HER2 Sobreexpresado y similar a células basales), que se asocian en su mayoría a grados histológicos altos. Existen algunas excepciones, particularmente en el grupo de células basales donde

encontramos algunos tipos histológicos especiales con grados histológicos bajos y por lo tanto mejor pronóstico (Rakha *et al*, 2010a;Weigelt *et al*, 2010b).

Tabla 2. Clasificación TNM del CIM

CLASIFICACIÓN TNM DEL CIM	
T	DEFINICIÓN
0	NO EVIDENCIA DE TUMOR
1mic	Tumor infiltrante $\leq 1\text{mm}$ en su diámetro mayor
1a	Tumor infiltrante $> 1\text{mm}$ y $\leq 5\text{mm}$ en su diámetro mayor
1b	Tumor infiltrante $> 5\text{mm}$ y $\leq 10\text{mm}$ en su diámetro mayor
1c	Tumor infiltrante $> 10\text{mm}$ y $\leq 20\text{mm}$ en su diámetro mayor
2	Tumor infiltrante $> 20\text{mm}$ y $\leq 50\text{mm}$ en su diámetro mayor
3	Tumor infiltrante $> 50\text{mm}$ en su diámetro mayor
4a	Tumor que infiltra la pared torácica
4b	Ulceración y/o edema de la piel sin criterios de CM inflamatorio
4c	4a + 4b
4d	Carcinoma inflamatorio
N	
0	NO EVIDENCIA DE METÁSTASIS GANGLIONAR
0 (ITC)	Presencia de células tumorales aisladas
1mic	Microinvasión ganglionar (depósito $> 0,2\text{mm}$ y $\leq 2\text{mm}$) en 1 - 3 ganglios linfáticos
1a	Metástasis ganglionar en 1 - 3 ganglios linfáticos
2a	Metástasis ganglionar en 4 - 9 ganglios linfáticos
3a	Metástasis ganglionar en 10 o más ganglios linfáticos y/o afectación ganglio supraclavicular ipsilateral
M	
0	NO EVIDENCIA DE METÁSTASIS A DISTANCIA
1	Evidencia de metástasis a distancia

T: Tumoración. N: Afectación ganglionar. M: Metástasis a distancia. mic: microinvasión. ITC: agrupaciones de células tumorales aisladas, tomado de su abreviatura en inglés (Isolated tumor cell clusters) (Edge *et al*, 2009;Lester *et al*, 2009)

1.1.3. Estadificación tumoral

La estadificación que se realiza de los tumores de mama mediante el sistema TNM (Tabla 2) nos sirve para realizar una clasificación en estadios clínicos y tiene en cuenta el tamaño tumoral, las metástasis a ganglios linfáticos y las metástasis a distancia (Tabla 3). Múltiples estudios han valorado el tamaño tumoral y la afectación ganglionar como factores pronósticos. Se considera que los tumores con mayor tamaño tienen mayor riesgo de presentar recurrencias o metástasis a distancia, al igual que los tumores

que se presentan con afectación ganglionar en el momento del diagnóstico (Cianfrocca & Goldstein, 2004).

Tabla 3. Estadios clínico-patológicos del CM

ESTADIFICACIÓN DEL CM			
ESTADIO	DEFINICIÓN		
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

is: *in situ*. mi: micrometástasis. M: metástasis a distancia(Edge *et al*, 2009).

La afectación ganglionar es el factor pronóstico clínico más consistente en el CIM temprano. Su valor pronóstico se relaciona con el número de ganglios con metástasis obteniéndose recurrencias a más corto plazo en pacientes con mayor número de ganglios afectados (Cianfrocca & Goldstein, 2004). No obstante, la estadificación ganglionar hoy en día se realiza mediante biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC). El concepto del ganglio centinela, aplicado al CM, se basa en la hipótesis de la diseminación secuencial. Esta hipótesis concibe que un tumor maligno primario drena inicialmente hacia un determinado ganglio linfático, ubicado en un grupo ganglionar regional. El ganglio centinela es el primer ganglio que recibe el drenaje linfático del tumor primario. La BSGC limita el estudio histológico a la valoración microscópica de un sólo ganglio linfático inicialmente. Si el ganglio centinela resulta negativo para la

afectación metastásica no hay indicación de realizar una linfadenectomía axilar, por el contrario si es positivo se realiza una linfadenectomía reglada para proceder a la valoración histológica de todos los ganglios regionales. La linfadenectomía se continúa realizando de rutina en el caso de pacientes con axila clínicamente positiva (Mohsin, 2012).

A pesar de la limitación numérica del estudio, la BSGC ha demostrado ser eficaz en la confirmación de ausencia de afectación ganglionar con una tasa de detecciones mayores del 95% (Cianfrocca & Goldstein, 2004). Las determinaciones realizadas sobre la valoración de un único ganglio linfático ya se encuentran incluidas dentro de los actuales protocolos de estadificación, manteniendo un importante valor pronóstico en el CIM (Mohsin, 2012).

1.2. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA DE MAMA

Con el advenimiento de la era molecular, el estudio del CM se ha centrado en la expresión génica y mutacional de los tumores de la mama. Los primeros estudios basados en la realización de técnicas de *microarrays* de ADNc, identificaron cuatro grupos de tumores que se clasificaron según sus perfiles de expresión génica. A un grupo de especímenes de tejido mamario, que se agrupaban por tener genes relacionados con los receptores hormonales y que además expresaban genes relacionados con las células luminales del tejido mamario normal se les denominó RE+ luminal *like*. Los otros tres subtipos de agrupaciones genéticas eran independientes de los receptores hormonales y se clasificaron según tuvieran expresión del gen *ERBB2* (subtipo HER2 Sobreexpresado), no tuvieran expresión de HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2, siglas tomadas de su nombre en anglosajón) pero que expresaran genes de proliferación (basal-*like*), o un grupo de genes relacionados con las células basales pero sin las dos características previamente mencionadas (HER2+ ni proliferación), a los que nombraron como patrón similar al de la mama normal (Perou *et al*, 2000). En estudios posteriores del mismo grupo se realizó la subdivisión del grupo Luminal en al menos dos subtipos, Luminal A y Luminal B, caracterizados por presentar un pronóstico y patrón de expresión génica diferente (Sorlie *et al*, 2001) (Figura 1).

A partir de esta clasificación y con la tipificación molecular del CM se han desarrollado fármacos dirigidos a nuevas dianas terapéuticas específicas con mejoría de la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de algunos de estos grupos tumorales. Sin embargo, el uso generalizado de perfiles de expresión génica en la clínica habitual es restringido, existiendo un gran interés en la utilización de marcadores de IHQ para clasificar los tumores en subgrupos que tengan las mismas características que los subtipos identificados en los estudios de expresión génica (Tang *et al*, 2009).

La técnica de tinción IHQ ha permitido la valoración de la expresión de múltiples marcadores celulares que identifican los diferentes subtipos moleculares del CM, demostrando ser una herramienta eficaz y reproducible para el diagnóstico (Callagy *et al*, 2003), aunque la correlación no es totalmente precisa (Figura 2).

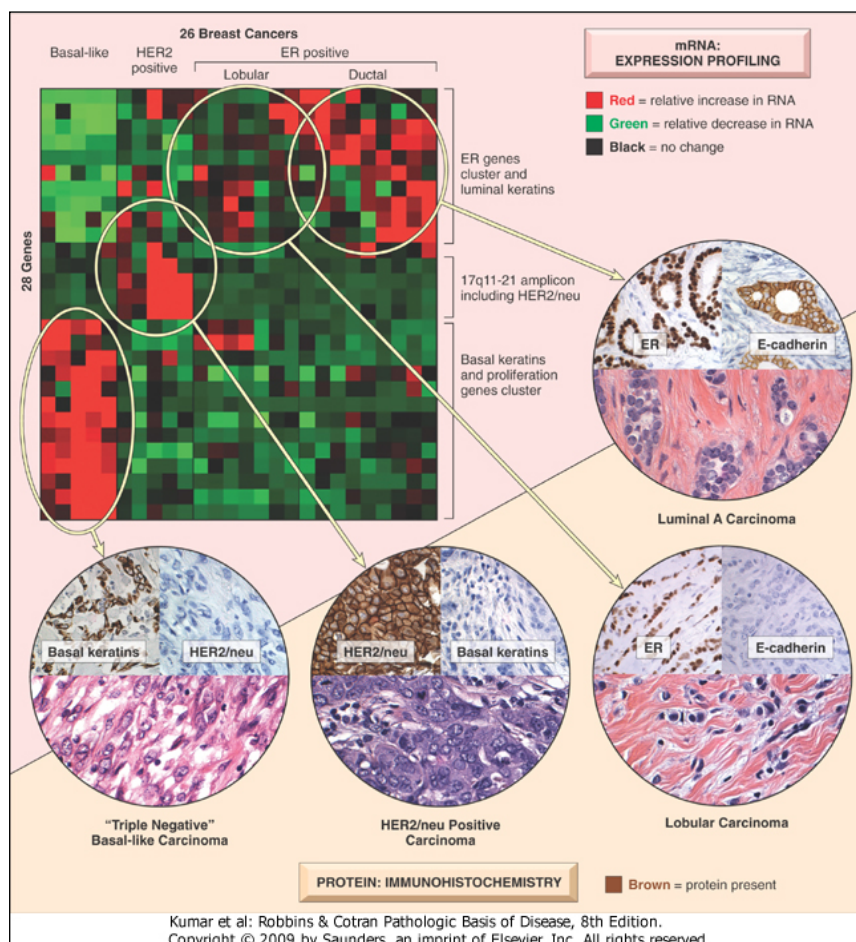


Figura 2. Correlación de la localización de los subtipos moleculares de CM en el *microarray* y los marcadores IHQ específicos de cada grupo (Kumar *et al*, 2009).

De acuerdo a la integración de la valoración molecular e IHQ se definen los subtipos de CM como (Tabla 4):

- Luminal A: Los tumores que expresan citoqueratinas (CK) luminales (CK8/18), presentan alta expresión de receptores hormonales (RE y/o receptor de progesterona (RP)), ausencia de sobreexpresión de HER2 y baja expresión de marcadores de proliferación celular (Ki67) (Subik *et al*, 2010;Uribe *et al*, 2010).
- Luminal B: Tumores con expresión de CK8/18, expresión de RE y/o RP, y alta expresión de Ki67 (Cheang *et al*, 2009;Hu *et al*, 2006;Zepeda-Castilla *et al*, 2008). Este grupo de tumores no suele presentar amplificaciones de *HER2* asociadas (Perou *et al*, 2000), sin embargo existe un grupo de tumores luminales RE+ que expresan HER2 y portan la amplificación del gen. Estos tumores se caracterizan por tener un comportamiento biológico más agresivo y peor pronóstico que los tumores Luminales A, por lo cual se han clasificado por algunos autores dentro del subtipo Luminal B y comprenden aproximadamente el 30% de estos tumores (Cancer Genome Atlas Network, 2012;Cheang *et al*, 2009;Millar *et al*, 2011;Sorlie *et al*, 2001).
- El grupo HER2 Sobreexpresado se define por la sobreexpresión de la proteína HER2 que se considera positiva cuando la valoración IHQ es igual a 3+ y por la presencia de la amplificación del gen *HER2* que se evalúa mediante técnica de Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en todos los casos con determinación IHQ igual a 2+ (Harris *et al*, 2007;Wolff *et al*, 2013). Además, este grupo presenta ausencia de expresión de receptores hormonales y mayoritariamente alta expresión de marcadores de proliferación celular (Cianfrocca & Gradishar, 2009;Perou *et al*, 2000;Weigelt *et al*, 2010a;Zepeda-Castilla *et al*, 2008).

- En cuanto al grupo de tumores similares a las células basales, son tumores que no expresan receptores hormonales ni HER2 y se caracterizan por la expresión de marcadores de células basales (citoqueratina 5/6, CK17 y/o CK14 y/o p63). Además estos carcinomas expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que en los grupos anteriores raramente se expresa (Cho *et al*, 2008a;Korsching *et al*, 2008;Sousa *et al*, 2010;Badve *et al*, 2011). Tradicionalmente se les ha denominado según su expresión IHQ como "Triple Negativos" pero esta denominación es imprecisa debido a que se ha demostrado que no todos los tumores con perfil molecular basal son Triple Negativos y viceversa (Alvarenga *et al*, 2012;Badve *et al*, 2011;Kumar *et al*, 2012).

Tabla 4. Relación de los subtipos moleculares de CM y la expresión de marcadores IHQ.

CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA MAMARIO					
SUBTIPO	RE/RP	HER2	Ki67	CK BASALES	EGFR
LUMINAL A	++	-	<14%	-	-/+
LUMINAL B	+	-/+	>14%	-	-/+
HER2 SOBREEXPRES.	-	2+ Ampl ó 3+	Bajo /Alto	-	-/+
SIMILAR A CEL. BASALES	-	-	Bajo/Alto	++	+
SIMILAR A LA MAMA NORMAL	-	-	Normal/Bajo	-	-

RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de progesterona; CK: Citoqueratinas; Ampl: amplificado; Cel: células

- El quinto subtipo de tumores descrito por el grupo de Perou *et al* denominado similar a la mama normal, se caracteriza por no presentar inmunorreactividad para RE/RP, HER2, CK5/6 o CK17 ni EGFR. Se trata por lo tanto de tumores triple negativos que no expresan citoqueratinas basales (triple negativos no basales) y que presentan diferente comportamiento biológico con un pronóstico diverso (en general se catalogan como de pronóstico intermedio) (Parker *et al*,

2009). Algunos autores los denominan como inclasificables, indeterminados o de fenotipo nulo (Alvarenga *et al*, 2012; Sousa *et al*, 2010), debido a que los estudios iniciales incluían tumores con alto contenido de tejido estromal o adiposo y muestras de tejido mamario normal, por lo tanto se ha considerado que pueden corresponderse con un artefacto de la técnica molecular, o un probable nuevo subtipo de tumor que no se ha logrado determinar con exactitud su perfil génico (Badve *et al*, 2011; Parker *et al*, 2009; Weigelt *et al*, 2010a).

Múltiples estudios han demostrado que los tumores del subtipo Luminal A, que representa el 50-70% de los CIM (Munirah *et al*, 2011; Tang *et al*, 2009), en general son tumores con mayor grado de diferenciación, de crecimiento lento, que se presentan en grupos de edad más avanzada y tienen mejor pronóstico comparado con los otros subtipos moleculares (Rosen P., 2009; Subik *et al*, 2010). Debido a su alta expresión de RE/RP las respuestas al tratamiento hormonal son óptimas, mostrando una tasa de SLE muy superior al resto de los grupos.

Los tumores del subtipo Luminal B tienen un comportamiento biológico más agresivo que los Luminales A. Este rasgo de progresión se ha atribuido a que son carcinomas de mayor grado histológico, con alto índice de proliferación celular, que presentan peor respuesta a la hormonoterapia y mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad (Cheang *et al*, 2009; Weigelt *et al*, 2010a). Así mismo se relacionan con mayor riesgo de compromiso ganglionar regional (Tang *et al*, 2009). Otro hallazgo que les confiere mayor agresividad es la asociación a mutaciones de *p53* en un porcentaje mucho mayor que el presentado por el subtipo Luminal A (Millar *et al*, 2011; Dumay *et al*, 2013).

Además, dentro de este subtipo molecular (Luminal B) encontramos todos aquellos tumores que expresan genes de tipo luminal con rasgos poco comunes como: ausencia o baja expresión de RE con coexpresión de RP, y los tumores con baja expresión de receptores hormonales y coexpresión de HER2. Los carcinomas Luminales B que expresan HER2 son los de peor pronóstico asemejándose más al comportamiento clínico de los tumores del subtipo HER2 Sobreexpresado, por lo tanto la línea

terapéutica usada en estos Luminales B HER2+ es la dirigida al bloqueo del HER2 (Cheang *et al*, 2009).

El subtipo HER2 Sobreexpresado representa aproximadamente el 15% de los CIM (Weigel & Dowsett, 2010), suelen ser tumores poco diferenciados con alto índice de proliferación y se asocia frecuentemente con metástasis ganglionares, metástasis al sistema nervioso central y viscerales (Bozza *et al*, 2013;Dowsett *et al*, 2009;Duchnowska *et al*, 2009;Patani *et al*, 2013;Subik *et al*, 2010;Uribe *et al*, 2010). Presentan alta tasa de respuesta a la quimioterapia con antraciclinas y taxanos, sin embargo hoy en día cuentan con un tratamiento específico con trastuzumab (Herceptin®), anticuerpo monoclonal que reconoce y se une selectivamente a la molécula HER2, bloqueando la acción del receptor y por lo tanto actuando directamente sobre la vía molecular de la sobreexpresión de la proteína (Dowsett *et al*, 2009;Larsen *et al*, 2013;Wolff *et al*, 2007). El curso de la enfermedad de las pacientes con CM pertenecientes a este subtipo tumoral ha mejorado sustancialmente, como consecuencia del uso de trastuzumab como primera línea de tratamiento (Patani *et al*, 2013), mostrando un aumento de las tasas de SG y SLE en este grupo de pacientes (Bozza *et al*, 2013;Dowsett *et al*, 2009).

Los tumores similares a las células basales (basal *like*/Triple Negativos) son los de peor pronóstico con un curso clínico más agresivo. Usualmente son de alto grado histológico, con altos índices mitóticos, suelen presentar rasgos histológicos metaplásicos y medulares y se asocian con metástasis a distancia (Sorlie *et al*, 2001;Sousa *et al*, 2010;Weigelt *et al*, 2010a). Además son el subtipo molecular de CIM con SG más cortas (Sousa *et al*, 2010). Se ha encontrado una fuerte relación de este subgrupo de carcinoma de mama en mujeres portadoras de la mutación *BRCA1* (Jonsson *et al*, 2010;Kumar *et al*, 2012;Rosen P., 2009;Tang *et al*, 2009) así como mayor proporción de mutaciones de *p53* de alta complejidad (Dumay *et al*, 2013).

Debido a la ausencia de dianas terapéuticas dirigidas a tumores Triple Negativos y subtipo molecular similar a las células basales, se siguen utilizando pautas de quimioterapia sistémica convencional en el tratamiento de estos carcinomas con altas tasas de recaídas y quimioresistencias (Korsching *et al*, 2008;Lerma *et al*, 2009).

1.3. RECEPTORES HORMONALES

1.3.1. Receptor de estrógenos (RE)

El RE es una proteína perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares, los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión a ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas y patológicas. Se ha identificado el RE en diferentes tejidos y tipos celulares, en donde su acción difiere según el tejido en que se encuentre (Marquez, 2002). Hoy en día se reconocen dos tipos de receptores de estrógenos el RE α y RE β , que son codificados por distintos genes y su expresión varía según el tipo de tejido (Marquez, 2002; Noriega-Reyes & Langley, 2008; Badve & Nakshatri, 2009) (Figura 3). La distribución tisular de los dos tipos de receptores es distinta; así, los RE α se expresan principalmente en la mama normal, en células del CM, en el endometrio, en el estroma ovárico y en el hipotálamo, mientras que los RE β se observan en la mama normal, la próstata, el riñón, el cerebro, el hueso, el corazón, el pulmón, etc., pero no se conoce muy bien el papel del mismo en el CM (Noriega-Reyes & Langley, 2008; Badve & Nakshatri, 2009).

El RE está formado por seis dominios denominados de la A a la F. La región amino-terminal (dominios A/B) contiene la región de transactivación AF-1 que le confiere una función de activación de la transcripción génica ligando independiente y además, contiene varios sitios de fosforilación importantes en la activación del receptor en ausencia de la hormona (Marquez, 2002; Noriega-Reyes & Langley, 2008). La activación de AF-1 se realiza mediante la fosforilación inducida por diversas cinasas como MAP y AKT/PKB (Badve & Nakshatri, 2009). Adyacente a los dominios A/B se encuentra el dominio de unión al ADN (DBD) o dominio C. Este dominio contiene dos dedos de zinc mediante los cuales se une a secuencias específicas en el promotor de los genes regulados por estrógenos (Marquez, 2002; Noriega-Reyes & Langley, 2008). Consecutivamente se encuentra el dominio D o región bisagra que es el sitio de unión de la proteína de choque térmico hsp90, la cual permanece unida al receptor mientras se encuentre inactivo (Marquez, 2002). En la región carboxi-terminal (dominios E/F) se encuentra el dominio de unión al ligando (LDB), donde se une el estrógeno y los ligandos sintéticos que pueden ser antagonistas totales o moduladores selectivos del RE, activando o inhibiendo al receptor. En el LDB se encuentra la región de transactivación

AF-2, que es dependiente del ligando, el cual promueve su interacción con coactivadores transcripcionales (Marquez, 2002; Noriega-Reyes & Langley, 2008). Es en esta región donde el tamoxifeno predominantemente ejerce su acción (Badve & Nakshatri, 2009) (Figura 3).

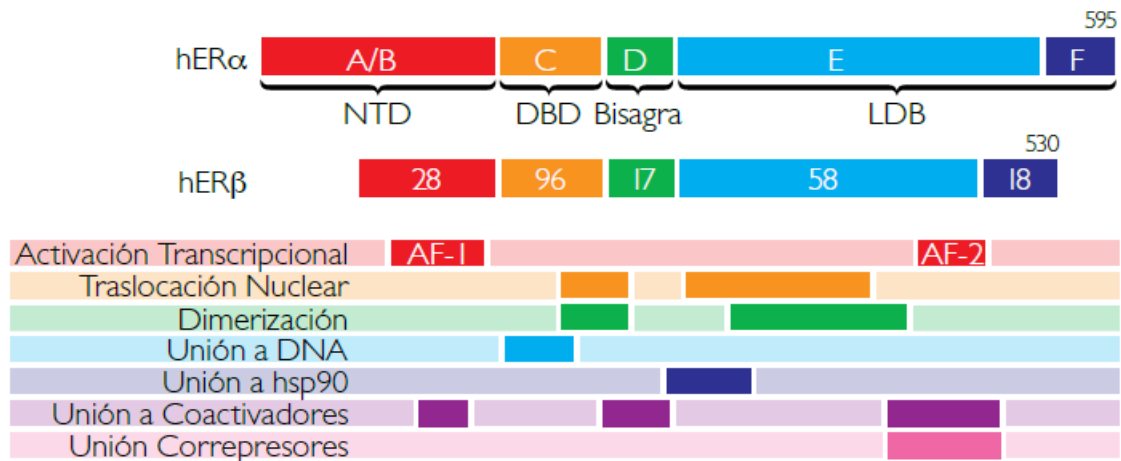


Figura 3. Receptor de estrógenos alfa (hERα) y Receptor de estrógenos beta (hERβ) con sus dominios. A/B - NTD: Dominio transcripcional, donde se encuentra la región AF1. C - DBD: Dominio de unión al ADN. D: región bisagra, región de unión a hsp90. E/F - LDB: Dominio de unión al ligando. Región carboxi-terminal donde se encuentra la región AF2 sitio de unión a coactivadores y correpresores (Noriega-Reyes & Langley, 2008).

Los RE, en ausencia de ligando, se localizan mayoritariamente en el citoplasma, aunque existe actualmente alguna evidencia de que también pueden estar en el núcleo, hallándose inactivados por su unión a la proteína hsp90 (Sommer & Fuqua, 2001). La unión del receptor al ligando (estrógenos) rompe dicha unión y lleva a su activación, lo que provoca la translocación del receptor hacia el núcleo, donde sufre un cambio conformacional, formando dímeros (Figura 4). Estos dímeros, por acción de la tirosina-quinasa intrínseca, se autofosforilan y activan. Posteriormente se unen a regiones específicas del ADN (elementos de respuesta a hormonas). Mediante el acoplamiento de proteínas correguladoras (coactivadoras o correpresoras), los dímeros activados son capaces de activar o no regiones promotoras de genes que inducen a la activación de la vía MAP-cinasa, activando los genes *c-fos* y *c-jun*, los cuales codifican las proteínas c-Fos y c-Jun que, tras combinarse entre sí, conforman el factor de transcripción AP-1 estimulando la proliferación celular (Al *et al*, 2011) (Figura 5).

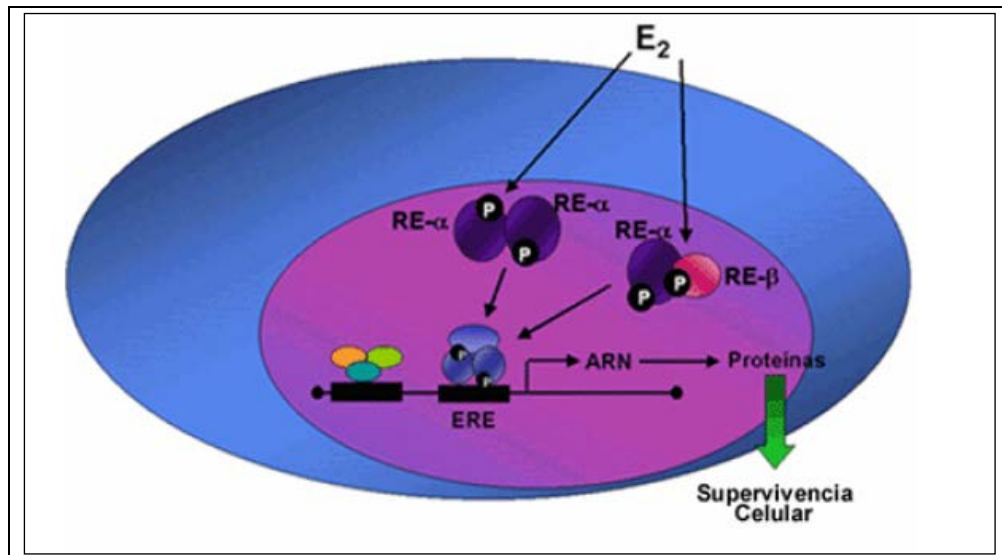


Figura 4. Efectos "Genómicos" del receptor de estrógeno. Activación del RE- α o RE- β al unirse el ligando estradiol-17b (E₂), fosforilación, unión al ERE y activación de la transcripción con la consecuente estimulación de la síntesis de genes que promueven la supervivencia celular (Marquez, 2002)

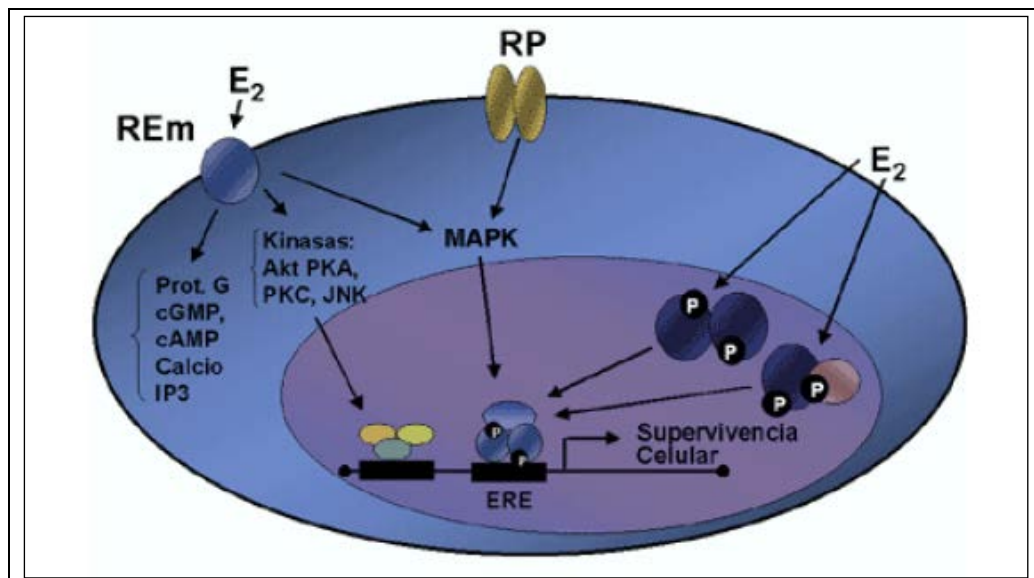


Figura 5. Efectos "No Genómicos" del receptor de estrógeno de membrana. El estradiol 17-b (E₂) se une a receptores de membrana (REm) y activa diferentes cascadas de señalización que estimulan la activación de mecanismos genómicos. Entre los efectos mediados por el receptor de membrana están la activación de canales de Ca²⁺, proteínas G, interacción con receptores de péptidos (RP), activación de cinasas, etc... (Marquez, 2002).

En las células del CM se ha identificado el RE α que se activa con la unión a la hormona y a través de otras vías de fosforilación por medio de factores de crecimiento inducidos por proteínas cinasas. La función del RE activado en las células del CM se ha correlacionado con la diferenciación y proliferación celular (Badve & Nakshatri, 2009).

La expresión positiva de RE ha sido crucial en la clasificación de los subtipos moleculares e inmunohistoquímicos del CIM. Adicionalmente se considera un factor predictivo y pronóstico sólido en el CM y un marcador de la respuesta a tratamientos dirigidos a la síntesis estrogénica o al bloqueo de la acción de este receptor (Badve & Nakshatri, 2009;Hammond *et al*, 2010;Patani *et al*, 2013).

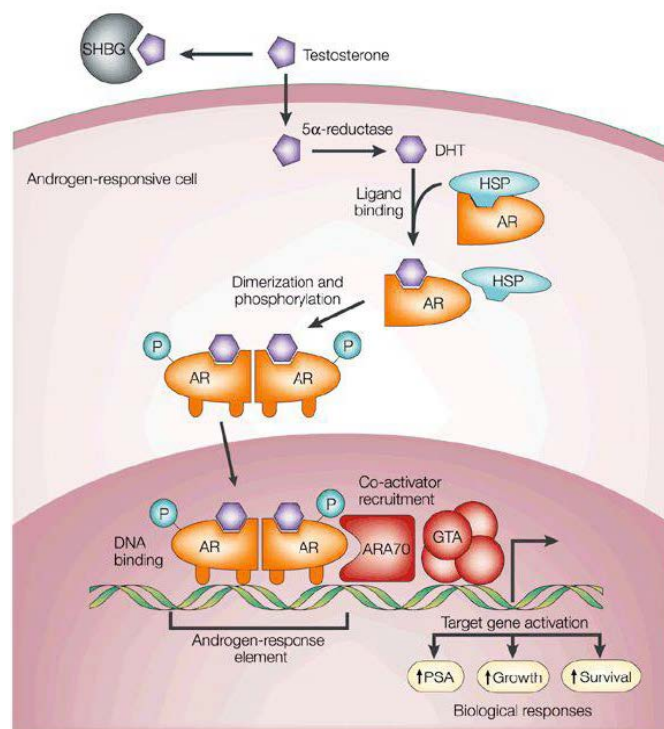
1.3.2. Receptor de progesterona (RP)

El RP es un receptor esteroideo que se une específicamente a la progesterona, al igual que el RE pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y factores de transcripción y tiene un papel en el desarrollo de diversos tejidos entre los cuales está el tejido mamario (Mote *et al*, 2007). El RP está codificado por el gen *PGR1* localizado en el cromosoma 11q22, que es un gen regulado por estrógenos y por lo tanto su expresión en el CM se asocia a una vía RE α intacta (Payne *et al*, 2008). Se han descrito principalmente dos isoformas del receptor: RPA y RPB, que son codificadas por el mismo gen pero que operan a través de diferentes vías de señalización (Wen *et al*, 1994). Las células coexpresan usualmente las isoformas RPA y RPB con actividad biológica distinta, ya que el RPB funciona como activador transcripcional y el RPA actúa como inhibidor, por lo que el ratio RPA/RPB es crítico para determinar las funciones en las que interviene la progesterona (Guerra & Camacho I, 2000;Wen *et al*, 1994).

La expresión de RP en el CIM es conocida y aunque su valor pronóstico individual es motivo de debate, su valor predictivo asociado a la expresión de RE está reconocido (Patani *et al*, 2013;Payne *et al*, 2008). Se ha observado que los tumores que presentan baja expresión de RP se asocian a mayor agresividad y proliferación tumoral. Por otro lado, existe un pequeño e infrecuente grupo de tumores luminales que expresan RP pero no tienen expresión de RE (Rakha *et al*, 2010b). Estos tumores presentan respuestas aceptables a las terapias de adyuvancia hormonal, lo que según algunos autores justifica el uso de tamoxifeno o de inhibidores de aromatasa en las pacientes con tumores con este perfil de expresión (Patani *et al*, 2013;Payne *et al*, 2008).

1.3.3. Receptor de andrógenos (RA)

Otro miembro de la familia de receptores nucleares es el RA, que al igual que RE y RP regula la transcripción génica a través de la unión a un ligando, en este caso los andrógenos, testosterona y dihidrotestosterona. El RA está codificado por el gen *RA* que se localiza en el cromosoma Xq12 y presenta dos isoformas llamadas RA-A y RA-B (Wilson & McPhaul, 1994). Se reconocen otras formas de activación del RA a través de la inducción de cascadas de transducción mediadas por segundos mensajeros (proteínas cinasas, entre otros) que están involucradas en procesos de diferenciación y proliferación celular (Figuras 6 y 7). Su función principal está relacionada con el desarrollo y maduración de los órganos reproductivos masculinos, pero se reconocen diversas funciones en otros tejidos masculinos y femeninos (Heinlein & Chang, 2002).



Nature Reviews | Cancer

Figura 6. Receptor de Andrógenos (AR) y vía de activación ligando dependiente. DHT: Dihidrotestosterona (ligando). SHBG: Globulina de unión a hormonas sexuales (tomado de sus siglas en inglés, sex hormone binding globuline). HSP: proteínas de choque térmico (heat shock protein) (Feldman & Feldman, 2001).

En el CIM se ha observado expresión de RA en un alto porcentaje de tumores, que co-expresan o no otros receptores hormonales (RE-RP), lo que ha llevado a investigar su relación en la biología, comportamiento y pronóstico del CM (Park *et al*,

2010;Robinson *et al*, 2011). A pesar de que la mayoría de los tumores RA positivos también expresan RE y se han relacionado significativamente con menor tamaño tumoral y bajo grado histológico, su valor pronóstico aún no ha sido validado (Park *et al*, 2010;Subik *et al*, 2010). Recientemente se determinó otro subtipo molecular de CM denominado Apocrino Molecular que se caracteriza por tener características histológicas apocrinas, presentar expresión de RA y ausencia de RE, pero que en su firma molecular expresa genes del subtipo luminal, lo que demuestra su heterogeneidad (Farmer *et al*, 2005;Robinson *et al*, 2011). Así mismo, se ha observado que los tumores del subtipo Apocrino Molecular tienen una alta asociación con amplificaciones de *HER2* contrariamente a los tumores Luminales RA+ (Farmer *et al*, 2005;Park *et al*, 2011) (Figura 7). Estos resultados sugieren que RA tiene un papel como marcador de respuesta endocrina en los tumores RE+ y puede llegar a ser una diana terapéutica en el subgrupo de tumores RE- que incluye el subtipo Apocrino Molecular (Park *et al*, 2011;Farmer *et al*, 2005).

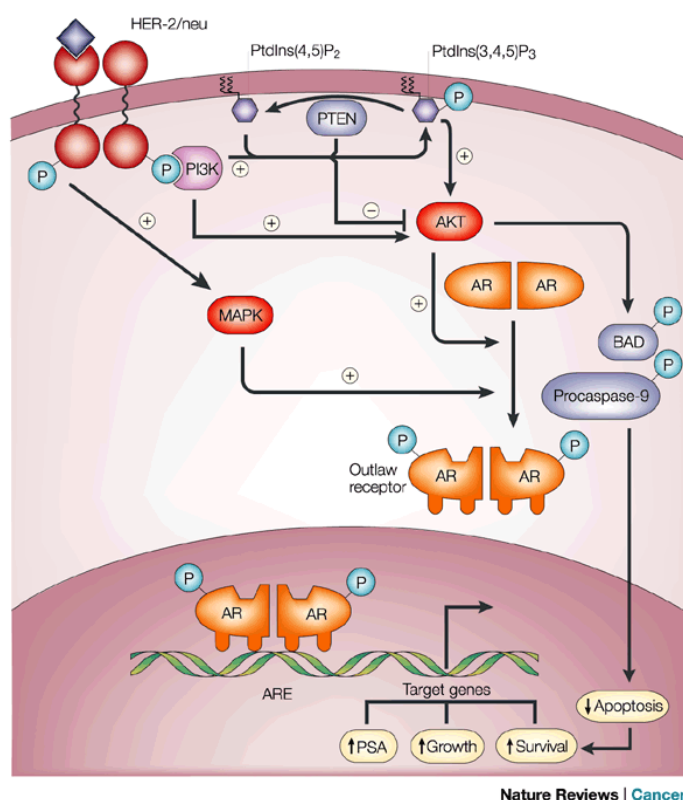


Figura 7. Célula con HER2 Sobreexpresado. HER2 activa indirectamente a la MAP-cinasa (MAPK), la cual fosforila al receptor de andrógenos (AR) y lo activa con el consecuente aumento del crecimiento y proliferación celular. AR también puede ser activado por la proteína cinasa B (AKT) que es activada por el fosfatidilinositol trifosfato (PtdInst(3,4,5)P₃). Los niveles de PtdInst(3,4,5)P₃ aumentan con la activación de la cinasa fosfatidilinositol 3 (PIK3) mediada por HER2 (Feldman & Feldman, 2001).

1.4. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO HUMANO 2 (HER2)

HER2 es un receptor de transmembrana con actividad tirosina-cinasa miembro de la familia EGFR, está codificado por el oncogen *ERBB2*, también conocido como *HER2*, que se localiza en el cromosoma 17q12. Se trata de una glucoproteína de 185 kDa con un dominio externo N-terminal rico en cisteína de 110 kDa (p110), un dominio transmembrana y un dominio intracelular C-terminal de 95 kDa (p95) el cual presenta actividad tirosina-cinasa (Cho *et al*, 2008a;Gutierrez & Schiff, 2011).

La activación del receptor precisa, en primer lugar, de la unión con un ligando, aunque en el caso de HER2 no se conoce ninguno. En segundo lugar dicho receptor debe interactuar con otro receptor de estructura idéntica o relacionada (familia EGFR) y dimerizarse para desencadenar la fosforilación del dominio intracitoplasmático y activar las cascadas de señales. Una vez producida la dimerización, los residuos específicos de tirosina en la porción intracelular del receptor HER2 se fosforilan, iniciando la propagación de la señal al activarse la proteína y encender la actividad enzimática de la siguiente. La activación del HER2 inicia múltiples vías de señalización celular que promueven la proliferación, la supervivencia, la motilidad y la adhesión celulares (RAS/MAPK, PI3K/AKT; Fosfolipasa C, STAT y proteína cinasa C) (Figura 8) (Gutierrez & Schiff, 2011).

La amplificación del *HER2* se ha encontrado en 20-30% de los CIM, donde juega un rol esencial en la patogénesis de estos tumores. Hoy en día se reconoce ampliamente su valor pronóstico (Choritz *et al*, 2011;Harris *et al*, 2007;Park *et al*, 2006;Patani *et al*, 2013). La sobreexpresión de HER2 se correlaciona con la ausencia de expresión de RE, debido a que existe una regulación negativa entre estos dos receptores. Se ha descrito que aproximadamente la mitad de los CM que presentan amplificaciones del *HER2* expresan niveles bajos de RE y/o RP. Así mismo, con frecuencia presentan mutaciones de *p53*, haciendo de estos tumores un grupo especial de neoplasias con peor pronóstico y comportamiento biológico más agresivo que el resto de tumores hormonodependientes (Cheang *et al*, 2009;Gutierrez & Schiff, 2011;Loi *et al*, 2007). El conocimiento de la estructura y función del HER2 ha llevado al desarrollo de las nuevas

dianas terapéuticas específicas que son el pilar del tratamiento actual de los CIM HER2+.

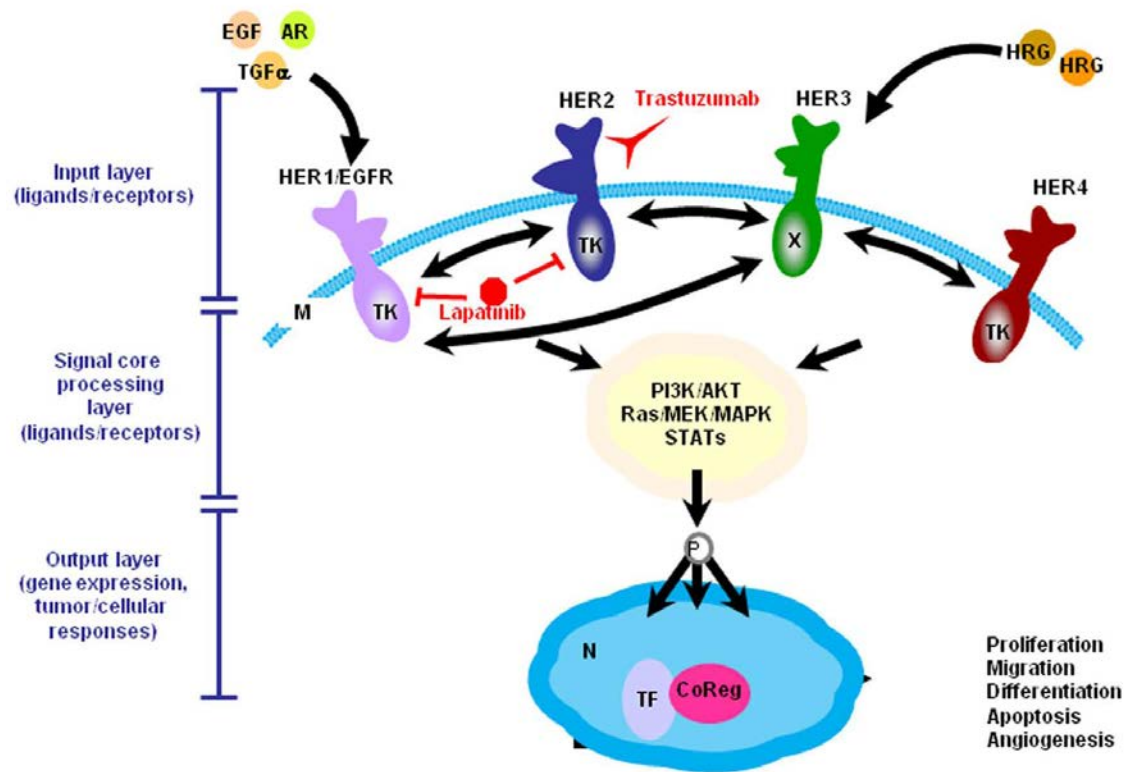


Figura 8. Vías principales activadas por la señalización de HER2. Receptores de membrana (M) tirosina cinasa (TK) de la familia EGFR (HER1, HER2, HER3 y HER4). Ligandos: EGF, AR (anfirregulina), TGF α , HRG (Hergulinas). N: núcleo. TF: Factores de transcripción. CoReg: Factores Correguladores. HER2 no tiene ligando pero se activa mediante heterodimerización con la unión a otro receptor HER (1 y 3) o mediante la homodimerización. La activación de HER2 conlleva a la fosforilación (P) de las moléculas implicadas en las vías de señalización PI3K/AKT, Ras/MEK/MAPK y STATs, con el consiguiente inicio de transcripción génica que promueve la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis celular, así como la angiogénesis. Las moléculas trastuzumab, que se une al dominio externo de HER2, y lapatinib que se une al dominio TK de HER1 y HER2, se utilizan en el tratamiento de los tumores HER2 ya que bloquean su acción (Gutierrez & Schiff, 2011).

1.5. MARCADORES DE PROLIFERACIÓN (Ki67)

La proteína Ki67 es una proteína nuclear que se asocia a la proliferación celular y esta codificada por el gen *MKI67* localizado en el cromosoma 10q25-ter (Yerushalmi *et al*, 2010). Esta proteína se expresa en las fases activas del ciclo celular G1, S, G2 y M, pero no en la fase de reposo G0, lo que la hace un adecuado marcador de la proliferación (Scholzen & Gerdes, 2000). En el tejido mamario normal la expresión nuclear de Ki67 es hasta del 3%, mientras en el tejido neoplásico se han descrito

diferentes índices de proliferación que se correlacionan con datos de agresividad tumoral y pronóstico (Cheang *et al*, 2009;Subik *et al*, 2010;Yerushalmi *et al*, 2010). Se ha observado que los tumores con mayor expresión de Ki67 tienen buena respuesta a la quimioterapia y se corresponden con los grupos de CM con peor pronóstico, como el similar a las células basales. Además, la evaluación de la expresión de Ki67 ha sido crucial en la división del subtipo Luminal en A y B. Hoy en día, es el parámetro IHQ mejor aceptado para la identificación de estos subtipos y un buen biomarcador pronóstico dentro de los tumores hormonodependientes (Cheang *et al*, 2009;Kobayashi *et al*, 2013;Sorlie *et al*, 2001).

Los puntos de corte de la evaluación IHQ de Ki67 han sufrido variaciones durante los últimos años con la intención de establecer un umbral de valoración del índice de proliferación celular que tenga valor pronóstico significativo. Actualmente se acepta que los índices de Ki67 mayores al 14% se corresponden a tumores de alto riesgo y por lo tanto, presentan peor pronóstico (Cheang *et al*, 2009;Millar *et al*, 2011;Yerushalmi *et al*, 2010).

1.6. PROTEÍNA Bcl2

La proteína Bcl2 (tomado de sus siglas en inglés: B cell lymphoma 2) fue descrita en los estudios de la translocación (14;18) de los linfomas B foliculares. Posteriormente se evidenció que no era específica de esta translocación y que además de los linfocitos se expresaba en diferentes tejidos (normales y neoplásicos), incluyendo los tejidos hormonoregulados. Se trata de una proteína que se localiza en la membrana interna mitocondrial y que esta codificada por el protooncogen *Bcl2* localizado en el cromosoma 18q21 (Jorge *et al*, 2007). Su función es inhibir la apoptosis, proceso por el cual le proporciona a la célula mayor riesgo para adquirir cambios genéticos de tipo oncogénico (Rosen P., 2009) y promueve la proliferación celular. A pesar de su papel prooncogénico en la célula, se ha observado que en el CM existe mayor expresión de Bcl2 en los tumores hormonodependientes (luminales), que suelen ser de menor grado histológico y presentan mayor diferenciación celular. Esta asociación se basa en que la expresión de Bcl2 se correlaciona positivamente con la expresión de RE y RP y negativamente con la expresión de p53, mostrando su fuerte relación con los carcinomas

hormonoregulados. En este grupo de tumores mamarios se ha identificado que la expresión de Bcl2 proporciona un mejor pronóstico con mayores tasas de SG y SLE que en los tumores Bcl2 negativos (Callagy *et al*, 2008;Kim, 2012)).

1.7. PROTEÍNA p53

El gen supresor de tumores *p53* codifica la proteína proapoptótica p53, que tiene como función principal la detección de células con daños del ADN, promoviendo la reparación de dichas alteraciones o la apoptosis en aquellas células con daños irreparables del ADN (Ellis *et al*, 1997). Las mutaciones de *p53* se han visto implicadas en el proceso de carcinogénesis de múltiples tejidos, incluyendo la mama (Dumay *et al*, 2013). Las alteraciones de p53 se han observado en mayor proporción en el subtipo similar a las células basales y dentro de los luminales al subtipo B, ambos grupos con mayores índices de proliferación y peor pronóstico, por lo tanto suele asociarse a los grupos de carcinoma más agresivo. Existe una clara asociación entre la presencia de mutaciones *p53* y mutaciones *BRCA1* lo cual sugiere que p53 tiene un rol importante en los CM hereditarios (Kumar *et al*, 2012).

1.8. PROTEÍNA CICLINA D1 (CCND1)

La proteína Ciclina D1 (CCND1) es una proteína de 34kDa perteneciente a la familia de proteínas ciclinas reguladoras de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Está codificada por el gen *CCND1* localizado en el cromosoma 11q13 (Roy & Thompson, 2006;Tobin & Bergh, 2012). La CCND1 se une a las CDK4 o CDK6 formando los complejos CCND1-CDK4/6 que junto con el complejo CiclinaE-CDK2 fosforilan e inactivan a la proteína retinoblastoma (Rb), promoviendo la progresión de la fase G1 a fase S del ciclo celular (Lin *et al*, 2002;Mylona *et al*, 2013;Roy & Thompson, 2006). Otra función independiente de la unión a CDKs de la CCND1 (Mylona *et al*, 2013), en los tejidos hormonoregulados, es la activación de RE, la cual realiza uniéndose al dominio hormonal del receptor en ausencia de su ligando, proceso que promueve la unión de RE a sus genes dianas y el inicio de la transcripción génica mediada por RE (Lin *et al*, 2002;Roy & Thompson, 2006;Tobin & Bergh, 2012).

La expresión de CCND1 en el CIM se ha observado en el 50 al 80% de estos tumores, lo que ha generado interés en el estudio de su papel oncogénico en el CM. Así mismo, se ha encontrado amplificación del gen *CCND1* en el 5 al 20% de los CIM (Mu *et al*, 2011;Roy & Thompson, 2006;Roy *et al*, 2010). Existe una fuerte correlación entre la expresión de CCND1 y RE, evidenciándose, contradictoriamente a lo esperado, que la mayoría de los tumores que expresan CCND1 son de bajo grado histológico, se encuentran bien diferenciados y pertenecen al subtipo luminal (Cho *et al*, 2008b;Hu *et al*, 2009;Peurala *et al*, 2013). Sin embargo, la expresión de CCND1 no es exclusiva de los CIM RE+, ya que una pequeña proporción de tumores RE- sobreexpresan CCND1. En estos tumores RE-, la expresión de CCND1 confiere un mejor pronóstico (Roy *et al*, 2010;Tobin & Bergh, 2012;Mylona *et al*, 2013).

A pesar de que los tumores que sobreexpresan la proteína tienen en general un pronóstico favorable, aquellos carcinomas que además tienen *CCND1* amplificada presentan un pronóstico más desfavorable (Patani *et al*, 2013;Tobin & Bergh, 2012), especialmente los portadores de altas amplificaciones (Roy *et al*, 2010). Hoy se reconoce que la amplificación de *CCND1* es un marcador de respuesta al tratamiento hormonal en los tumores RE+, obteniendo mejores respuestas en los tumores con expresiones bajas o moderadas de la proteína. Existen discrepancias entre los resultados obtenidos por los diferentes autores, por lo cual el papel pronóstico de CCND1 continua siendo tema de debate (Harris *et al*, 2007;Patani *et al*, 2013;Peurala *et al*, 2013).

1.9. PROTEÍNAS DEL CICLO CELULAR

El mecanismo de división celular es sustancialmente el mismo en todas las células del organismo y ha sido ampliamente conservado durante la evolución. El papel fundamental del ciclo celular es asegurarse de que las células dupliquen correctamente su contenido cromosómico, y evitar que se perpetúen lesiones genéticas. El paso de la célula a través del ciclo celular conlleva una serie compleja de acontecimientos para conseguir dividirse en dos células hijas idénticas, con copias exactas de su material genético. El ciclo celular está compuesto de cuatro etapas: G1, S, G2 y M, que regulan el crecimiento y división celular. Normalmente la célula se encuentra en fase G1, donde es metabólicamente activa y cumple sus funciones fisiológicas. Cuando la célula se va a

dividir entra a la fase S (de síntesis de ADN para la duplicación del material genómico), consecutivamente pasa a G₂ (intervalo-replicación) y M (mitosis) (Kumar *et al*, 2009;Pillay *et al*, 2011) (Figura 9).

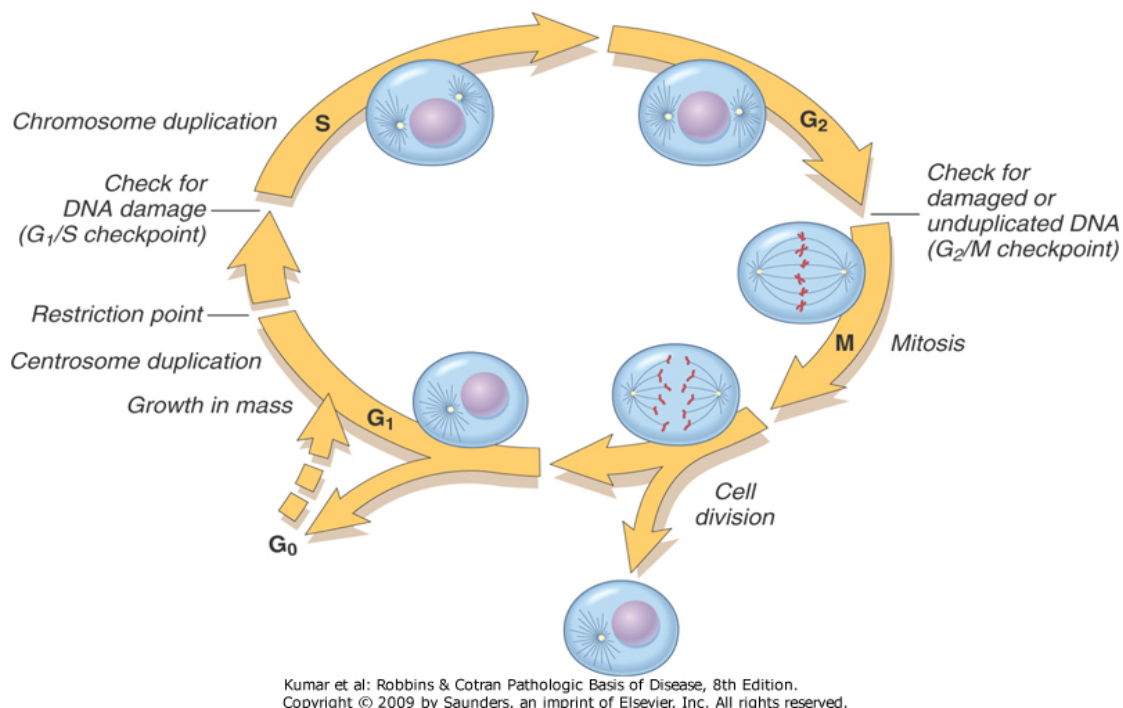


Figura 9. Fases del ciclo celular (G₀, G₁, S, G₂ y M) y puntos de control (checkpoint) (Kumar *et al*, 2009).

Para garantizar el adecuado progreso del ciclo existen puntos de control donde se ponen en marcha vías reguladoras formadas por proteínas ciclinas (denominadas por letras de A hasta K), CDKs que requieren de la unión específica a ciclinas para ser activadas, inhibidores de las CDKs (proteínas de la familia INK4: p15, p16, p18 y p19 y proteínas de la familia KIP: p21, p27 y p57) y proteínas supresoras de tumores (p53, Rb). La interacción molecular de estas subunidades permite la activación de los genes necesarios para la progresión del ciclo o el arresto celular (Kumar *et al*, 2009;Pillay *et al*, 2011) (Figura 10).

El primer punto de control que vigila la progresión de G₁ a S es de vital importancia en el proceso de proliferación celular y tumorigénesis, por lo que ha sido y sigue siendo de interés en el CIM. Las vías reguladoras que forman parte de esta fase de transición son p16-CCND1-CDK4/6-Rb y p21/p27-CiclinaE-CDK2, que a su vez son moduladas por p21-p53 (Caldon *et al*, 2006;Caldon *et al*, 2010).

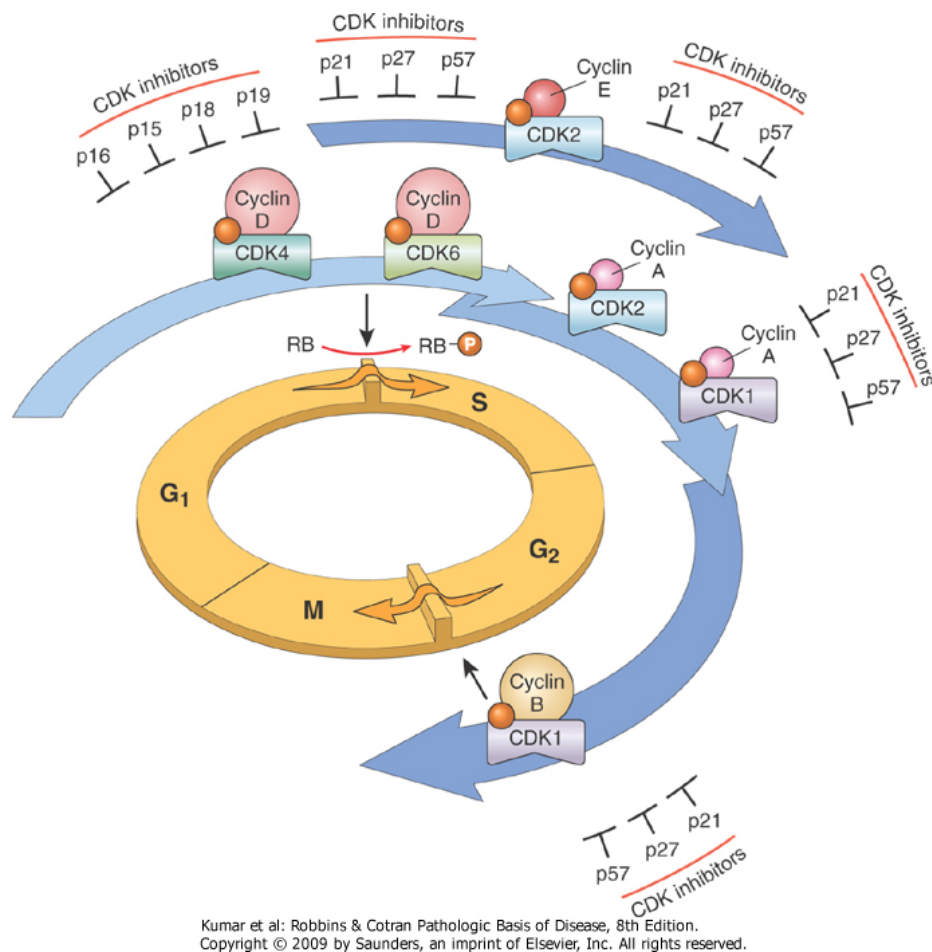


Figura 10. Localización de los complejos ciclinas-CDK y de los inhibidores de las CDK dentro del ciclo celular (Kumar *et al*, 2009)

La proteína Rb está codificada por el gen supresor de tumores *RB*, localizado en el cromosoma 13q14.2 (Dávalos-Salas & Recillas-Targa, 2011;Peurala *et al*, 2013). Rb en su forma activa (hipofosforilada) forma un complejo con factores de transcripción E2F, evitando la transición G1-S y promoviendo el arresto celular. Puede ser inactivada mediante la fosforilación que realizan los complejos CCND1-CDK4/6 y CiclinaE-CDK2, disociándose de E2F, factor de transcripción que activa a los genes necesarios para la progresión a la fase S (Peurala *et al*, 2013) (Figura 10). Además el complejo CCND1-CDK4-6 promueve el secuestro y localización citoplasmática de los inhibidores de CDK p21 y p27, manteniendo la actividad cinasa y por lo tanto la fosforilación del Rb (Caldon *et al*, 2006) (Figura 11). La baja actividad de Rb se ha asociado con grados histológicos altos en el CIM.

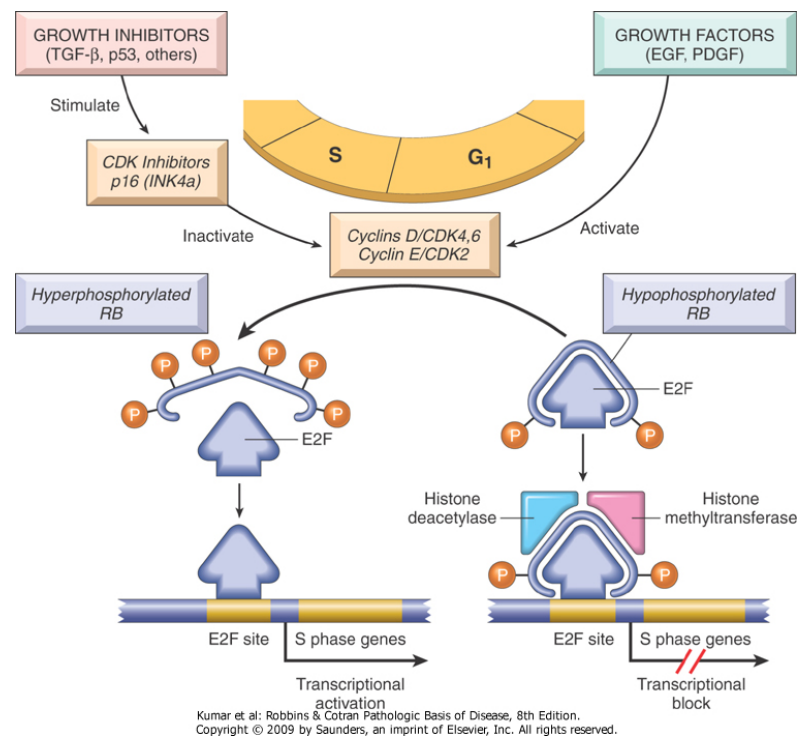


Figura 11. Vía de activación/inactivación de la proteína Rb dentro del ciclo celular. (Kumar *et al*, 2009)

La proteína p27 es un potente inhibidor del complejo CiclinaE-CDK2 al cual se asocia dentro del núcleo, manteniendo así la actividad de Rb (Caldon *et al*, 2006; Miyai *et al*, 2012; Pillay *et al*, 2011). Su función depende de los niveles de expresión y su localización subcelular. La fosforilación de p27 promueve la migración de la molécula del núcleo al citoplasma celular, donde no puede interactuar con las CDKs permitiendo la progresión del ciclo (Kariagina *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2010). En el CIM se ha observado que niveles bajos de p27 se correlacionan con tumores de mayor grado histológico, fenotipos más agresivos, presencia de invasión linfovascular y metástasis a ganglios linfáticos (Caldon *et al*, 2010; Pillay *et al*, 2011).

Otro inhibidor del complejo CiclinaE-CDK2 es la proteína p21, que pertenece a la familia KIP de inhibidores de CDKs. Promueve el arresto celular en la fase G1 realizando la inhibición de la actividad cinasa de los complejos ciclinas-CDKs inducida por la acción de p53, ante la detección de alteraciones en el ADN que requieran reparación (Ellis *et al*, 1997). Sin embargo, en diversos estudios se ha observado

actividad inhibitoria de p21 independiente de p53, a través de mecanismos que todavía son sujeto de investigación (Pellikainen *et al*, 2003). También se ha asociado la expresión de p21 en el proceso de diferenciación celular de diversos tejidos. En la diferenciación queratinocítica, p21 induce la regulación positiva del gen *IGF-1* y mejora la señalización de las vías MAPK, a través de una acción independiente de su dominio ciclina-CDK (Caldon *et al*, 2010).

Los múltiples estudios que valoran la expresión de p21 en CM muestran resultados contradictorios, asociándose de manera positiva y negativa los altos niveles de p21 con marcadores de proliferación y observándose sobreexpresión en tumores de bajo y alto grado (Pellikainen *et al*, 2003). Sin embargo, hay una tendencia a relacionar la expresión baja de p21 con tumores de mayor grado histológico y los altos niveles de p21 con alta actividad proliferativa en los carcinomas hormonodependientes (Caldon *et al*, 2010; Pellikainen *et al*, 2003).

p16 es otra proteína inhibidora de las CDKs, que está codificada por el gen *CDKN2*. p16 actúa como un supresor tumoral al unirse a CDK4 y CDK6, evitando la formación del complejo CCND-CDK4/6 y manteniendo de esta forma a Rb hipofosforilado (Biankin *et al*, 2002; Kumar *et al*, 2009). La hipermetilación del gen se ha descrito en múltiples carcinomas y en el estudio realizado por Lee J. *et al* se describe metilación del promotor de p16 en un 52% de los carcinomas infiltrantes, por lo cual sugieren puede ser un evento de importancia en la carcinogénesis del CIM (Lee *et al*, 2012).

En diversos estudios se ha observado que la sobreexpresión de p16 se relaciona con altos grados histológicos, negatividad para RE, alta actividad proliferativa y por lo tanto peor pronóstico (Lee *et al*, 2012; Milde-Langosch *et al*, 2001), sin embargo, algunos autores lo han asociado a mejor tasa de SLE en sus poblaciones estudio (Peurala *et al*, 2013), lo que demuestra la heterogeneidad y controversia de los resultados.

La implicación pronóstica de estas proteínas en el CIM ha sido y sigue siendo de interés en el campo de la investigación.

1.10. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

1.10.1. GATA3

La proteína 3 de unión a la secuencia de ADN [A/T]GATA[A/G] conocida como GATA3, es un factor de transcripción miembro de la familia de factores de transcripción en dedos de zinc (Liu *et al*, 2012; Voduc *et al*, 2008). Está codificada por el gen *GATA3*, uno de los genes altamente expresados en el perfil de expresión génica de los CM hormonodependientes denominados como subtipo Luminal (A y B) (Jacquemier *et al*, 2009; Perou *et al*, 2000). Su función la cumple induciendo cambios conformacionales en la cromatina que hacen accesibles las regiones reguladoras del ADN a otros factores de transcripción o proteínas, poniendo en marcha la transcripción génica (Badve & Nakshatri, 2009; Engelsen *et al*, 2008).

GATA3 juega un papel esencial en la embriogénesis, proliferación, desarrollo y diferenciación de diversos tejidos, dentro de los cuales encontramos las células epiteliales del lumen de la mama (Cimino-Mathews *et al*, 2013; Voduc *et al*, 2008). Se ha observado una alta expresión IHQ de GATA3 en el CIM, llegando a ser mayor del 90%, y en carcinomas uroteliales, mientras que tumores de otros tejidos no presenta expresión de GATA3, por lo cual se le ha atribuido un papel como marcador específico de origen mamario/urotelial en el estudio de carcinomas de origen desconocido (Cimino-Mathews *et al*, 2013; Liu *et al*, 2012). Su expresión se correlaciona positivamente con la expresión de RE, encontrándose ausencia o baja expresión de GATA3 mayoritariamente en el grupo de tumores Triple Negativos, así como una correlación negativa con la expresión de marcadores basales (Albergaria *et al*, 2009).

En estudios previos de CIM se ha observado una fuerte correlación entre la alta expresión de GATA3 y RE, así como asociación a tumores con mayor diferenciación celular, con mejor pronóstico y supervivencia (Cimino-Mathews *et al*, 2013; Yoon *et al*, 2010). La baja expresión de GATA3 se ha relacionado con recurrencia después del tratamiento del CM independientemente del estadio clínico, grado histológico y expresión de otros marcadores (Badve & Nakshatri, 2009; Mehra *et al*, 2005; Voduc *et al*, 2008).

1.10.2. FOXA1

El factor de transcripción FOXA1 (Forkhead box protein A1) es una proteína codificada por el gen *FOXA1*, que forma parte del grupo de genes que conforman la firma molecular del subtipo Luminal del CIM (Ademuyiwa *et al*, 2010;Perou *et al*, 2000;Sorlie *et al*, 2001). FOXA1 es esencial en el desarrollo de las células del hígado, páncreas, riñón y pulmón, así como en la morfogénesis ductal de la mama (Bernardo *et al*, 2010;Wolf *et al*, 2007).

Se ha observado que FOXA1 tiene un rol importante como mediador de la función de RE. FOXA1 favorece la exposición de sitios de unión en el ADN para que a través de la unión de otros factores de transcripción como GATA3 y RE se establezca la transcripción génica, siendo esencial en el mecanismo de proliferación de los tumores del subtipo Luminal (Albergaria *et al*, 2009;Badve & Nakshatri, 2009;Fu *et al*, 2011;Hurtado *et al*, 2011). FOXA1 se requiere para la óptima expresión de los genes regulados por REa como *CCDN1* y *RA* entre otros (Bernardo *et al*, 2010;Robinson *et al*, 2011;Robinson *et al*, 2013). También se ha encontrado que la sobreexpresión de FOXA1 se asocia al bloqueo de la progresión metastásica, que realiza modulando la expresión de p27 y promoviendo la expresión de E-cadherina (Mehta *et al*, 2012;Wolf *et al*, 2007).

En las células epiteliales luminales del CM existe una correlación entre la expresión de FOXA1, GATA3 y RE (Albergaria *et al*, 2009;Badve & Nakshatri, 2009;Bernardo *et al*, 2010;Mehta *et al*, 2012). Se ha demostrado que estos tres factores se expresan en tumores con mayor grado de diferenciación y con mejor tasa de SLE (Bernardo *et al*, 2010). La baja expresión de FOXA1 atenúa la respuesta al estrógeno en las células del CM y por lo tanto conlleva a una proliferación celular independiente del estrógeno y es clave en los mecanismos de resistencia a las terapias hormonales (Hurtado *et al*, 2011). Por todo lo descrito anteriormente se considera que FOXA1 es un marcador de buen pronóstico en el CIM (Albergaria *et al*, 2009;Mehta *et al*, 2012;Wolf *et al*, 2007).

1.11. OTROS MARCADORES

1.11.1. GCDFP-15

La glicoproteína GCDFP-15 (siglas tomadas de su nombre en anglosajón: Gross Cystic Disease Fluid Protein-15) también llamada proteína inducida por la prolactina (PIP), forma parte de un grupo de tres proteínas diferentes que se han identificado en el fluido de los quistes mamarios y quistes asociados a la enfermedad fibroquística de la mama. La proteína GCDFP-15 se expresa en otros tejidos diferentes a la mama como en las glándulas salivales, glándulas ecrinas, glándulas lagrimales y todas las glándulas apocrinas, así como en las células serosas de las glándulas bronquiales y nasales. Se considera que GCDFP-15 es un marcador de la diferenciación glandular asociado con secreción apocrina (Viacava *et al*, 1998).

La expresión IHQ de GCDFP-15 se ha observado hasta en el 70% de los CIM y el 80% de los CM metastásicos, siendo un marcador específico de origen mamario, aunque su sensibilidad no es tan alta como la de otros marcadores (Bhargava *et al*, 2007). Se ha identificado mayor expresión de GCDFP-15 en los carcinomas apocrinos (mayor del 90%) y lobulillares (hasta el 90%) así como baja expresión o ausencia de inmunoreactividad de GCDFP-15 en carcinomas Triple Negativos (Huo *et al*, 2013). En el estudio de carcinomas de origen desconocido, la positividad para GCDFP-15 favorece el origen mamario pero la ausencia de inmunoreactividad no lo excluye. En la actualidad no se ha logrado demostrar ningún rol pronóstico de este marcador dentro del CM.

1.11.2. Aurora Kinasa A (AURKA)

La Aurora Kinasa A (AURKA) es una serina/treonina cinasa de 46kDa, codificada por el gen *STK15* localizado en el cromosoma 20q13 (Royce *et al*, 2004). Regula la transición de la fase G2 a la fase M del ciclo celular y su función está relacionada con la funcionalidad centrosómica, la segregación cromosómica y la citoquinesis (Siggelkow *et al*, 2012; Staff *et al*, 2010). Fosforila y modula la actividad de p53 produciendo su ubiquitinación y desestabilización mediada principalmente por MDM2 (Siggelkow *et al*, 2012). Se ha observado sobreexpresión de AURKA en

múltiples tumores de diferente origen. En el CM se ha encontrado amplificación de *STK15* hasta en un 12% de los tumores (Royce *et al*, 2004), pero el porcentaje de casos con sobreexpresión de la proteína es mucho mayor (entre 26 al 94%) en los CDI (Royce *et al*, 2004; Tanaka *et al*, 1999). La alta expresión de AURKA, se correlaciona con tumores de alto grado nuclear, alta expresión de HER2 y por lo tanto peor pronóstico (Royce *et al*, 2004; Siggelkow *et al*, 2012; Staff *et al*, 2010). Aunque no se ha logrado establecer claramente el papel de AURKA como marcador pronóstico, parece que es en el subgrupo RE+ y HER2- en el que tendría mayor implicación pronóstica (Ali *et al*, 2012; Siggelkow *et al*, 2012).

1.11.3. GDF15

El factor de crecimiento/diferenciación 15 (GDF15) también llamado citocina inhibidora de macrófagos 1 (MIC-1) ó factor de crecimiento transformante beta placentario (PTGF- β), pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento transformantes beta (TGF- β) que incluye múltiples proteínas involucradas en la hemostasis, diferenciación celular y remodelación tisular (Nickel *et al*, 2011; Wallin *et al*, 2011). El GDF15 es codificado por el gen *GDF15/MIC-1* localizado en el cromosoma 19p13.1 (Bottner *et al*, 1999; Fairlie *et al*, 1999). En condiciones normales se expresa en bajos niveles en diferentes tejidos que incluyen cerebro, mama, hígado, médula ósea, próstata y colon, sin embargo, tiene una alta expresión en placenta (Roth *et al*, 2010; Strelau *et al*, 2008). GDF15 juega un rol importante en los procesos de enfermedad, inflamación, reparación e hipoxia, y además se ha observado expresión en múltiples tumores malignos de diferente origen (Nickel *et al*, 2011; Roth *et al*, 2010).

En diferentes estudios se ha observado que la proteína p53 induce al GDF15, por ello se cree existe una relación funcional entre estos dos factores que juega un papel importante en las vías de la carcinogénesis (Strelau *et al*, 2008; Wallin *et al*, 2011). La acción del GDF15 en los tumores es diferente según el tipo de tejido y el estado de progresión tumoral, observándose funciones pro-apoptóticas en estados de lesiones preinvasivas en colon, mama y próstata, así como alta expresión en carcinomas metastásicos o en estadios avanzados, por ello no está claro si actúa como un gen supresor tumoral o un oncogen (Joshi *et al*, 2011; Roth *et al*, 2010; Strelau *et al*, 2008).

Así mismo se ha descrito que el GDF15 induce la fosforilación del HER2, lo que parece establecer una relación entre la expresión de GDF15 y la resistencia al tratamiento con trastuzumab en el CM. En un estudio realizado por Joshi JP *et al* se demostró que las líneas celulares resistentes al tratamiento con trastuzumab mostraban alta expresión GDF15. Por otro lado, los CM con sobreexpresión del HER2 y GDF15 tenían peor respuesta al tratamiento, debido a que la fosforilación del HER2 mediada por el GDF15 disminuye la sensibilidad al trastuzumab (Joshi *et al*, 2011).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

La heterogeneidad clínica y patológica de los CM es reflejo de las complejas bases moleculares subyacentes a su desarrollo, siendo también la responsable de las resistencias al tratamiento.

Mediante los estudios basados en los perfiles de expresión génica el CM puede clasificarse en diferentes grupos moleculares como Luminal A, Luminal B, HER-2 sobreexpresado y Triple Negativo, cada subtipo tiene un comportamiento biológico único y diferente.

En la actualidad en el estudio del CM, además de evaluar las variables clínico-patológicas clásicas como la edad, grado histológico, afectación ganglionar y el tamaño del tumor, se ha incorporado masivamente el estudio de 4 marcadores IHQ (IHC4): RE, RP, HER2 (incluyendo estudio de FISH para el grupo 2+) y Ki67 necesarios para predecir el pronóstico y establecer un plan terapéutico. La separación de grupos de pacientes con CM basadas en el panel IHC4 parcialmente se solapa con los subtipos moleculares.

Este sistema de clasificación presenta limitaciones, lo que conlleva a que muchas mujeres, especialmente las que tienen tumores receptores hormonales positivos y HER2 negativas, sean tratadas con quimioterapia de forma innecesaria.

El análisis de la expresión IHQ sobre matrices de tejido (TMA) de un amplio panel de biomarcadores relacionados con la vía de RE, proliferación, apoptosis y ciclo celular, podría ser una buena aproximación para mejorar la estratificación pronóstica y la terapia personalizada de las pacientes con CIM.

2.2. OBJETIVOS

1. Analizar la expresión de un amplio número de proteínas implicadas en la vía de RE, la proliferación, la apoptosis y el ciclo celular mediante técnica IHQ sobre TMA en piezas de mastectomía correspondientes a CIM.

2. Correlacionar los resultados del estudio IHQ con:

- Los parámetros clinicopatológicos clásicos: edad, tamaño tumoral, grado histológico, y estado de afectación de los ganglios linfáticos regionales.
- Con los factores predictivos del conjunto IHC4.
- Con los subtipos moleculares de carcinoma infiltrante: Luminal A, Luminal B, HER2 sobreexpresado y Triple Negativo.
- El seguimiento clínico de las pacientes: supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. SELECCIÓN DE CASOS Y RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Para el estudio se seleccionaron de manera aleatoria 188 casos de CIM procedentes de piezas de cuadrantectomías y mastectomías parciales y totales del archivo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta de Hierro durante los años 2002 al 2012. Todas las tinciones de Hematoxilina-Eosina (HE) de los casos fueron valoradas por la doctoranda Angela B. Ortiz (AO) y sus directoras de tesis las doctoras Carmen Bellas (CB) y Paloma Martín (PM), realizándose la revisión de los diagnósticos según los criterios de la OMS 2012 (Lakhani S, WHO classification of tumors of the breast 2012), y seleccionando de cada uno de los casos una muestra de tejido parafinado representativa del tumor para la posterior construcción de las TMA. Las muestras seleccionadas incluían CIM diagnosticados mediante biopsia con aguja gruesa (BAG), punción aspiración con aguja fina (PAAF) o biopsia quirúrgica con o sin arpón, desde Junio de 1998 hasta Junio de 2012. La recogida de datos clínicos para el análisis de supervivencia se continuó hasta el 30 de Septiembre de 2013.

De todos los casos se recogió retrospectivamente, mediante la revisión de los informes anatomopatológicos y las historias clínicas, la siguiente información: edad, sexo, tamaño tumoral, grado histológico según la clasificación modificada de Scarff-Bloom-Richardson (Lester S, CAP breast cancer protocols 2012), número de ganglios axilares con metástasis, fecha de diagnóstico, tipo de tratamiento (local y/o sistémico), fecha de recidiva (local, regional o a distancia) y fecha de muerte.

De las 188 muestras iniciales se excluyeron: 4 casos por tratarse de CIM en pacientes masculinos, 2 casos de carcinomas ductales *in situ* (CDIS) extensos con escasa representación tumoral del componente infiltrante y 3 casos con carcinomas infiltrantes mínimamente representados o con baja calidad técnica (defecto de fijación o corte) de la muestra para la posterior valoración microscópica, dejando así un total de 179 muestras válidas para el estudio.

Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro.

3.2. CONSTRUCCIÓN DE MATRICES DE TEJIDO (TMA)

Se realizó la valoración microscópica de las 179 secciones de los bloques de tejido, previamente teñidas con HE, seleccionando de cada muestra 2 áreas tumorales diferentes con adecuada representación tumoral, que posteriormente se marcaron en los bloques y se extrajeron de ellos 2 cilindros de 1mm de diámetro de cada caso, utilizando el Tissue Arrayer device (Beecher instrument, Silver Spring, MD, USA). Además se incluyeron 2 controles internos compuestos por cilindros de tejido mamario normal para asegurar la calidad, reproducibilidad y homogeneidad de las tinciones de las secciones. Se construyeron en total 6 TMA distintos que contenían 64 cilindros cada una.

3.3. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

El estudio IHQ se llevo a cabo mediante la utilización de 20 anticuerpos diferentes cuyas características se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en el estudio inmunohistoquímico.

MARCADOR	CLON	LABORATORIO	DILUCIÓN
RE	1D5	DAKO	1:200
RP	PGR636	DAKO	1:200
RA	AR441	DAKO	1:100
FOXA1	POLICLONAL	ABCAM	1:200
GATA3	POLICLONAL	ABCAM	1:50
p53	DO-7	NOVOCASTRA	1:50
Bcl2	124	ONCOGENE	1:50
HER2	POLICLONAL	DAKO	PREDILUIDO
Ki67	MIB-1	DAKO	1:50
p63	4A4	DAKO	1:100
p27	SXS368	DAKO	1:50
p21	EA10	ONCOGENE	1:25
RB	13A10	NOVOCASTRA	1:50
CCND1	SP4	DAKO	PREDILUIDO
GCDFP-15	23 A3	DAKO	1:50
AURKA	JLM28	NOVOCASTRA	1:50
p16	EGH4	MTM	PREDILUIDO
CK19	RCK108	DAKO	1:25
E-CADHERINA	36B5	NOVOCASTRA	1:50
GDF15	POLICLONAL	SIGMA-ALDRICH	1:50

De los bloques de TMA se cortaron secciones de 3µm que se secaron durante 16 horas en estufa a 56°C. Para las tinciones IHQ se utilizaron dos diferentes procedimientos automatizados: AutostainerLink 48 y Leica Bond III.

AutostainerLink 48

Las secciones que se tiñeron con los anticuerpos RE, RP, RA, HER2, Ki67, CCND1, p53, p63, Rb, Bcl2, CK19, AURKA, GCDPF-15 y E-Cadherina se procesaron en los sistemas de desparafinización y desenmascaramiento PTLINK de DAKO y en el teñidor automatizado AutostainerLink 48 (DAKO); proceso que incluye ordenadamente los siguientes pasos:

- Desparafinización con solución Target Retrieval, High pH TRIS/EDTA pH 9 (DAKO) y el desenmascaramiento antigénico a 95°C durante 20 minutos. Excepcionalmente para el anticuerpo Ki67 se utilizó la solución Target Retrieval Low pH en tampón citrato pH 6.1 (DAKO) según las instrucciones del fabricante.
- El bloqueo de la peroxidasa endógena, incubación del anticuerpo primario, sistema de visualización, revelado con Diaminobencidina y contratinción con hematoxilina, fueron realizados según el protocolo establecido por el fabricante en el AutostainerLink 48 (DAKO).

Leica BOND III

El procesamiento de las secciones de los bloques de TMA para los marcadores p16, p21, p27, GATA3, FOXA1 y GDF15 se realizó con el sistema automatizado de IHQ e Hibridación *in situ* Leica BOND-III (MENARINI), el cual realiza de forma conjunta y ordenada la desparafinización y desenmascaramiento antigénico de las secciones, utilizando la solución BOND Epitope Retrieval 1 (MENARINI) pH 6 en tampón citrato para los anticuerpos p21, p27, p16 y GATA3 durante 10 a 15 minutos y la solución BOND Epitope Retrieval 2 (MENARINI) pH 9 en tampón EDTA para las secciones de FOXA1 y GDF15 durante 15 minutos, según las instrucciones de Leica/MENARINI.

Tres diferentes investigadores (AO, CB, PM) utilizando los mismos criterios evaluaron independientemente la tinción IHQ de los TMA. En los casos discordantes se realizó una segunda valoración conjunta. La inmunotinción fue evaluada utilizando el porcentaje de expresión en células tumorales con patrón nuclear, citoplásmico o de membrana según los criterios previamente publicados y descritos en la literatura médica para cada anticuerpo valorado.

La tinción IHQ para los marcadores RE, RP, RA y HER2 fue evaluada de acuerdo a las recomendaciones del Colegio Americano de Patólogos (CAP)/Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) (Alvarenga *et al*, 2012;Gutierrez & Schiff, 2011;Hammond *et al*, 2010;Park *et al*, 2010;Sosinska-Mielcarek *et al*, 2013;Wolff *et al*, 2007). La valoración del Bcl2 se realizó utilizando los mismos umbrales que en la evaluación de los receptores hormonales (Bhargava *et al*, 1994). Los puntos de corte utilizados fueron (Tablas 6 - 8):

Tabla 6. Valoraciones IHQ de RE, RP y Bcl2

	RE, RP y Bcl2 (TINCIÓN NUCLEAR)	INTERPRETACIÓN
0	NEGATIVO	NEGATIVO
1	Entre el 1 y 25% de las células neoplásicas	POSITIVO BAJO
2	Entre el 25 y 50% de las células neoplásicas	POSITIVO BAJO
3	Más del 50% de las células neoplásicas	POSITIVO ALTO

Tabla 7. Valoración IHQ de RA

	RA (TINCIÓN NUCLEAR)	INTERPRETACIÓN
0	Menor del 10% de las células neoplásicas	NEGATIVO
1	Entre el 10 y 25% de las células neoplásicas	POSITIVO BAJO
2	Entre el 25 y 50% de las células neoplásicas	POSITIVO INTERMEDIO
3	Más del 50% de las células neoplásicas	POSITIVO ALTO

Tabla 8. Valoración IHQ de HER2

	HER2: HERCEPTEST (TINCIÓN DE MEMBRANA)	INTERPRETACIÓN
0	NEGATIVO	NEGATIVO
1	Tinción débil e incompleta en más del 10% de las células	NEGATIVO
2	Tinción completa débil/moderada en más del 10% , ó tinción completa e intensa en menos del 30% de las células	<i>BORDERLINE</i>
3	Tinción completa e intensa en más del 30% de las células	POSITIVO

En la evaluación microscópica del índice de proliferación celular Ki67, se escogió de cada cilindro el área de mayor expresión nuclear y se realizó una cuantificación de la inmunoreactividad en 100 células neoplásicas en dos campos de

gran aumento (40X). Las valoraciones se dividieron en cuatro grupos (0-3) determinados por el porcentaje de expresión según los siguientes criterios (Alvarenga *et al*, 2012; Cheang *et al*, 2009; Yerushalmi *et al*, 2010) (Tabla 9):

Tabla 9. Valoración IHQ de Ki67.

	Ki67 (TINCIÓN NUCLEAR)	INTERPRETACIÓN
0	NEGATIVO	NEGATIVO
1	Menor del 3% de las células neoplásicas	NEGATIVO
2	Entre el 3 y 14% de las células neoplásicas	BAJA PROLIFERACIÓN
3	Más del 14% de las células neoplásicas	ALTA PROLIFERACIÓN

La inmunotinción de p63 y CK19 fue valorada como negativa cuando no existía inmunorreactividad en ninguna célula tumoral infiltrante. La valoración fue positiva cuando se observó tinción nuclear fuerte para p63 y tinción de membrana y/o citoplasma para CK19 en alguna célula tumoral infiltrante (Shekhar *et al*, 2013; Vilardell *et al*, 2012). Para E-Cadherina las muestras fueron evaluadas como positivas cuando se observó inmunorreactividad de membrana en más del 10% de las células tumorales. (Alvarenga *et al*, 2012; Dabbs *et al*, 2013; Sosinska-Mielcarek *et al*, 2013; Sousa *et al*, 2010; Turashvili *et al*, 2011). Los anticuerpos CK19 y E-Cadherina se valoraron en los dos cilindros de cada muestra tumoral para realizar la confirmación inmunohistoquímica del tipo de tumor en conjunto, con la valoración de la técnica de HE, pero estos datos no se incluyeron dentro del análisis estadístico.

La evaluación IHQ de la CCND1 (Cho *et al*, 2008b; Cho *et al*, 2008a; Roy *et al*, 2010) y la proteína del ciclo celular p27 se realizó utilizando los siguientes puntos de corte (Tabla 10):

Tabla 10. Valoración IHQ de CCND1 y p27

	CICLINA D1 (NUCLEAR) y p27 (NUCLEAR Y/O CITOPASMÁTICA)	INTERPRETACIÓN
0	NEGATIVO	NEGATIVO
1	Menos del 10% de las células neoplásicas	NEGATIVO
2	Entre el 10 y 50% de las células neoplásicas	POSITIVO, BAJA EXPRESIÓN
3	Más del 50% de las células neoplásicas	POSITIVO, ALTA EXPRESIÓN

En la valoración del factor de transcripción GATA3 se utilizaron los umbrales determinados por estudios recientes en carcinomas (Cimino-Mathews *et al*,

2013;Engelsen *et al*, 2008;Liu *et al*, 2012). Los umbrales utilizados en la valoración fueron los descritos en la tabla 11:

Tabla 11. Valoración IHQ de GATA3

	GATA3 (TINCIÓN NUCLEAR)	INTERPRETACIÓN
0	NEGATIVO	NEGATIVO
1	Menor del 10% de las células neoplásicas	POSITIVO, BAJA EXPRESIÓN
2	Entre el 10 y 75% de las células neoplásicas	POSITIVO INTERMEDIO
3	Más del 75% de las células neoplásicas	POSITIVO, ALTA EXPRESIÓN

Los puntos de corte utilizados en la evaluación de la inmunotinción de FOXA1 determinados en estudios en CM (Naderi *et al*, 2012;Thorat *et al*, 2008), fueron modificados por la alta expresión positiva en nuestras muestras, realizándose una subdivisión de los casos positivos en baja y alta expresión según el porcentaje de núcleos positivos en cada cilindro, como se describe en la tabla 12:

Tabla 12. Valoración IHQ de FOXA1

	FOXA1	INTERPRETACIÓN
0	NEGATIVO	NEGATIVO
1	Menor del 10% de las células neoplásicas	POSITIVO, BAJA EXPRESIÓN
2	Entre el 10 y 80% de las células neoplásicas	POSITIVO INTERMEDIO
3	Más del 80% de las células neoplásicas	POSITIVO, ALTA EXPRESIÓN

La inmunoreactividad de la proteína del ciclo celular p16 fue evaluada como negativa cuando se observó tinción nuclear y/o citoplasmática en menos del 10% de las células tumorales y la expresión positiva se subdividió en dos grupos que se describen en la tabla 13 (Kroger *et al*, 2006;Lee *et al*, 2012):

Tabla 13. Valoración IHQ de p16

	p16 (TINCIÓN NUCLEAR Y/O CITOPLASMÁTICA)	INTERPRETACIÓN
0	Menos del 10% de las células neoplásicas	NEGATIVO
1	Entre el 10 y 50% de las células neoplásicas	POSITIVO BAJO
2	Más del 50% de las células neoplásicas	POSITIVO ALTO

La sobreexpresión de p53 y Rb fue determinada por la inmunorreactividad nuclear en más del 25% de las células tumorales evaluadas (1+) de cada cilindro (Martinez *et al*, 1993;Martinez *et al*, 1995). En el caso de p53 cuando la expresión era de intensidad fuerte y en más del 80% de las células tumorales se clasificó como 2+. Para el análisis estadístico de estos dos marcadores, las valoraciones se agruparon en

negativos: todas las muestras con expresión menor del 25% y positivos: los casos con inmunoreactividad mayor del 25%.

Como expresión positiva de GCDFP-15 se consideró positiva la tinción citoplasmática con refuerzo paranuclear en células neoplásicas (Huo *et al*, 2013), utilizando los siguientes cuatro puntos de corte (Tabla 14):

Tabla 14. Valoración IHQ de GCDFP-15

	GCDFP-15	INTERPRETACIÓN
0	NEGATIVO	NEGATIVO
1	Algunas células neoplásicas aisladas (<5%)	NEGATIVO
2	Entre el 5 y 80% de las células neoplásicas	POSITIVO, BAJA EXPRESIÓN
3	Más del 80% de las células neoplásicas	POSITIVO, ALTA EXPRESIÓN

La inmunotinción de p21 se evaluó como positiva cuando se observó tinción nuclear en células neoplásicas (Ellis *et al*, 1997; Pellikainen *et al*, 2003), utilizando los umbrales descritos en la tabla 15:

Tabla 15. Valoración IHQ de p21

	p21	INTERPRETACIÓN
0	NEGATIVO	NEGATIVO
1	Algunas células aisladas	NEGATIVO
2	Menos del 10% de células neoplásicas	POSITIVO BAJO
3	Más del 10% de células neoplásicas	POSITIVO ALTO

Para la Aurora kinasa A (AURKA) se consideró como expresión positiva la tinción citoplasmática en las células neoplásicas usando 4 puntos de corte descritos por Royce *et al* (Royce *et al*, 2004; Sen *et al*, 2002) (Tabla 16).

Tabla 16. Valoración IHQ de AURKA

	AURKA: AURORA KINASA A	INTERPRETACIÓN
0	NEGATIVO	NEGATIVO
1	Menos del 20% de las células neoplásicas	NEGATIVO
2	Entre el 20 y 50% de las células neoplásicas	POSITIVO BAJO
3	Más del 50% de las células neoplásicas	POSITIVO ALTO

En la evaluación de GDF15 se utilizó el punto de corte propuesto por Wallin *et al* modificado (Wallin *et al*, 2011) (Tabla 17).

Tabla 17. Valoración IHQ de GDF15

	GDF15	INTERPRETACIÓN
0	NEGATIVO	NEGATIVO
1	Menos del 15% de las células neoplásicas	POSITIVO BAJO
2	Más del 15% de las células neoplásicas	POSITIVO ALTO

Posterior a la valoración microscópica de todas las secciones, se seleccionó de los dos cilindros de cada muestra, el cilindro que presentaba mejor representación del tumor, mejor técnica de corte y tinción IHQ, para incluir el resultado de esta valoración finalmente en la evaluación estadística. En los casos en que las condiciones técnicas y la representación tumoral de ambos cilindros fueron óptimas y que se obtuvieron resultados IHQ diferentes atribuibles a la heterogeneidad propia del tumor, se seleccionó para el análisis estadístico, el resultado con mayor expresión del anticuerpo en estudio.

Según la expresión de los marcadores IHQ de RE, RP y Ki67 y la presencia de la amplificación de *HER2*, se agruparon los casos en cuatro grupos tumorales que representan los cuatro subtipos moleculares con diferentes comportamientos y pronóstico ya descritos anteriormente. Los grupos se determinaron como: Luminal A todos los casos RE+ y/o RP+/-, *HER2* no amplificado y Ki67 $\leq 14\%$; Luminal B las muestras con RE+ y/o RP+/- ó RE- y RP+ más *HER2* amplificado/no amplificado y Ki67 $>14\%$; *HER2* Sobreexpresado todos los casos con RE/RP negativo y *HER2* amplificado y grupo Triple Negativo todas las muestras tumorales sin expresión de RE/RP ni amplificación de *HER2*.

3.4. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Para la detección de la amplificación de los genes *CCND1* y *HER2/Neu*, se realizó hibridación *in situ* de todos los casos incluidos en el estudio. Se tomaron secciones de 3 μ m de los bloques parafinados de los 6 TMAs, las cuales se introdujeron en estufa a 55°C toda la noche.

La hibridación *in situ* del *HER2/Neu* se realizó utilizando la sonda LSI *HER2/CEP17* (Leica BOND) y el sistema automatizado de IHQ e Hibridación *in situ* Leica BOND-III (MENARINI), proceso que incluye: la desparafinización y

desenmascaramiento con solución BOND Epitope Retrieval 1 en tampón citrato pH 6, digestión enzimática realizada con mezcla de 3ml de BOND enzyme diluent (Leica) y 10µl de concentrado de enzima BOND (Leica) durante 5 a 25 minutos, desnaturalización de la sonda durante 10 minutos, hibridación *in situ* automatizada durante 12 horas con posteriores lavados posthibridación. La totalidad del procedimiento se realizó según las instrucciones del fabricante.

Para la hibridación *in situ* de **CCND1** se utilizó el procedimiento manual convencional utilizado en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta de Hierro. Una vez pasadas por la estufa se tomaron las secciones y se siguió el siguiente protocolo:

- Desparafinización: Introducir las preparaciones en Xilol en dos pases de 15 minutos cada uno.
- Rehidratación: Después del Xilol introducir las preparaciones en alcoholes de diferente graduación decreciente 100°, 86°, y 70° durante 2 minutos en cada uno. Dejar secar las secciones al aire 10 minutos.
- Pretratamiento en olla a presión con tampón citrato durante 2 minutos a máxima presión (100°C).
- Digestión con 10µl de proteinasa K a 37°C durante 10 minutos en el sistema de hibridación Hybrite (Vysis).
- Realizar 2 lavados de 5 minutos en 2xSSC (Abbott Molecular).
- Fijación de las secciones en formol al 1% durante 2 minutos.
- Deshidratación: Realizar 3 pases por alcoholes de diferente graduación creciente (alcohol de 70°, 85°, y 100°) durante 2 minutos en cada uno.
- Dejar secar las secciones al aire 10 minutos.
- Codesnaturalización e hibridación: Para la hibridación se utilizó una sonda diseñada para detectar la amplificación de **CCND1** (LSI Cyclin D1(11q13) SpectrumOrange/CEP11 SpectrumGreen probe de Abott Molecular) (Figura 12). Preparar la sonda disolviendo 1µl de la sonda en 7µl de Vysis LSI/WCP Buffer de hibridación (Abbott Molecular) y 2µl de agua destilada. Aplicar 10µl de la sonda reconstituida sobre las secciones de tejido, cubrir con un cubreobjetos y sellar los cristales con pegamento para evitar la evaporación. Colocar las secciones en el

Hybrite a 90°C durante 5 minutos e hibridar a 37°C durante toda la noche.

- Al día siguiente, realizar los lavados posthibridación para eliminar el exceso de sonda, con una solución de lavado 0.3% NP40/2xSSC (que se preparó con 1,5ml de solución detergente no iónica NP-40 (Abbott Molecular), 50ml de solución salina de citrato sódico 20xSSC (Abbott Molecular) y 450ml de agua destilada). La solución de lavado se dividió en dos recipientes Coplin, uno de ellos a temperatura ambiente donde se introducen las secciones al término de la hibridación hasta que se desprenden el cubreobjetos. Una vez desprendidos los cubreobjetos se pasan los cristales al segundo recipiente Coplin situado en un baño con la solución posthibridación a 73°C y se dejan durante dos minutos a esta temperatura. Hacer un último lavado de un minuto a temperatura ambiente en 0.1% NP-40/2xSSC. Secar las secciones al aire en oscuridad.

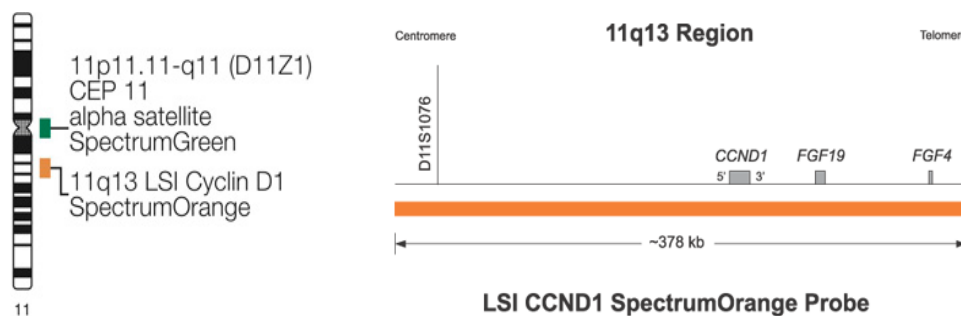


Figura 12. Sonda de amplificación LSI CCND1

- Finalmente se montan los portaobjetos con las secciones, aplicando 10µl de DAPI (Vectashield) para la posterior visualización en microscopio de fluorescencia.
- Almacenar a 4°C durante 15' antes de ver la hibridación

3.4.1. Valoración de la hibridación *in situ*

Todas las secciones fueron valoradas por dos investigadores (AO y PM), en microscopio de fluorescencia Leica DM 5000B, dotado de filtros para detectar el Spectrum Orange, Spectrum Green y DAPI. En los casos discordantes se realizó una

evaluación por un tercer investigador (CB) y se analizaron los resultados conjuntamente. En todos los cilindros de los 6 TMAs se valoraron dos áreas tumorales diferentes y se realizó la cuantificación de señales en al menos 25 células neoplásicas por cada área seleccionada. Se estableció como no valorables, todas aquellas secciones que presentaban menos de 50 células neoplásicas infiltrantes por cilindro y las muestras con defectos técnicos de corte o artefactos que imposibilitaban la adecuada valoración.

En la evaluación de la hibridación *in situ* del *HER2/Neu* se determinó el ratio entre señales rojas (locus del gen) y señales verdes (centroméricas) y se estableció como no amplificado todos los ratios menores a 1,8 y como amplificado los ratios mayores a 2,2, según las recomendaciones de la CAP/ASCO para HER2 2007 (Wolff *et al*, 2007;Gutierrez & Schiff, 2011).

Para la valoración de la amplificación de *CCND1* se establecieron 4 puntos de corte según el número de copias del locus (señales rojas) observadas (Cho *et al*, 2008a), clasificando los resultados como No Amplificado, *Borderline*, Amplificado bajo y Amplificado alto. En los casos donde se detectaron múltiples señales centroméricas por núcleo celular se determinó el ratio utilizando como punto de corte los ratios establecidos por Roy *et al* : no amplificado menor de 2,2 y amplificado mayor o igual a 2,2 (Roy *et al*, 2010). Los puntos de corte según número de copias fueron (Tabla18):

Tabla 18. Valoración microscópica del FISH de *CCND1*

	<i>CCND1</i> HIBRIDACIÓN IN SITU	INTERPRETACIÓN
0	Menos de 2 copias en al menos el 50% de los núcleos valorados	NO AMPLIFICADO
1	De 2 - 5 copias por núcleo en al menos el 50% de los núcleos valorados	<i>BORDERLINE</i>
2	De 6 -10 copias por núcleo en al menos el 50% de los núcleos valorados	AMPLIFICADO BAJO
3	Más de 10 copias por núcleo y/o presencia de madejas en al menos el 50% de los núcleos valorados	AMPLIFICADO ALTO

Cuatro casos de los TMA utilizados en la valoración de la amplificación de *CCND1* fueron clasificados como no valorables, posteriormente se seleccionó un bloque de tejido paraafinado con adecuada representación tumoral, sobre el cual se realizó la técnica de FISH para la adecuada valoración microscópica.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa SSPS 15.0 (SPSS. Inc., Chicago, IL, EEUU). Las correlaciones entre la expresión de los marcadores y las variables clínico-patológicas se realizaron aplicando el test de X^2 (Fisher exact test), considerando todos los cálculos hasta el nivel de significancia de 0.05.

Para el seguimiento de las pacientes se valoró la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG). La SLE se define como el tiempo, en meses, desde el diagnóstico hasta la fecha de recurrencia, última revisión médica, o fallecimiento por enfermedad. La SG se define como el tiempo, en meses, desde el diagnóstico hasta la última revisión médica, o fallecimiento por enfermedad. El punto de corte para el análisis de la supervivencia se estableció el 30 de septiembre del 2013.

Para el análisis de la SG y SLE se aplicó un estudio univariante de Kaplan Meier, donde se relacionaron los distintos factores de riesgo con el tiempo de supervivencia. Se utilizaron como puntos de corte en el seguimiento la fecha del último control clínico, la fecha de muerte, y/o la fecha de recaída de la enfermedad. El análisis estadístico de la SG y SLE se realizó para un periodo de 5 y 8 años (60 y 96 meses) de seguimiento. El estadístico de contraste utilizado fue el Log-Rank test con un nivel de significación establecido cuando la p era menor o igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

La muestra del estudio incluyó 179 casos, con una media de edad de 57.13 +/- 15.61 años (rango entre 28 y 93 años). Según los grupos de edad de riesgo 21 casos (11.7%) pertenecían al grupo de menores de 40 años, 108 casos (60.4%) se encontraron dentro del grupo de 40 a 65 años y en el último grupo que se corresponde con las mayores de 65 años se ubicaron 50 casos (27.9%).

El tamaño tumoral medio fue 2.84 +/- 1.91cm (rango entre 0.42 y 14.5cm). De las 179 muestras 70 casos (39.1%) eran tumores T1 (menor o igual a 2cm), 96 casos (53.6%) eran tumores T2 (entre 2,1 y 5cm) y 13 casos (7.3%) eran tumores T3 (mayores de 5cm en su diámetro principal). La afectación media de los ganglios regionales fue de 2.4 ganglios afectados +/- 4.44 (rango de 0 a 30 ganglios afectados) y se subdividió en cuatro grupos según la clasificación TNM. Se observó que 85 casos (47.5%) no presentaban afectación ganglionar (N0), 48 casos (26.8%) presentaban de 1 a 3 ganglios con metástasis neoplásica (N1), 26 casos (14.5%) con 4 a 9 ganglios afectados (N2) y 12 casos (6.7%) con más de 10 ganglios con metástasis tumoral o con afectación del ganglio supraclavicular ipsilateral (N3). Ocho casos (4.5%) no se pudieron clasificar ya que no se realizó linfadenectomía ni protocolo de BSGC, por tratarse de tumores en mujeres de edad avanzada con CIM avanzado y/o alta comorbilidad clínica (seis casos), por lo cual se individualizó el protocolo terapéutico según riesgo/beneficio. El caso restante al cual no se le realizó linfadenectomía se trataba de una mujer menor de 50 años que debutó con enfermedad metastásica cerebral por lo cual se instauró terapia sistémica. Según el grado histológico de diferenciación tumoral utilizando la clasificación de Nottingham, 31 casos (17.3%) eran bien diferenciados (GI), 66 casos (36.9%) eran moderadamente diferenciados (GII) y 82 casos (45.8%) pobremente diferenciados (GIII) (Tabla 19).

De los 179 casos, se perdió el seguimiento clínico de 21 (11.7%) pacientes, por traslado a otras instituciones o no cumplimiento del control clínico por parte de la paciente. Se encontró recaída de la enfermedad en 49 pacientes (27.4%): 34 pacientes

(19%) presentaron metástasis a distancia o recidivas locales, entendidas como recaída en lecho de mastectomía o axilar ipsilateral y 15 casos (8.4%) presentaron recidiva local y metástasis a distancia (Tabla 19). Las localizaciones metastásicas más frecuentes fueron: ósea (36.6%), pulmonar (25%), hepática (21.6%) y sistema nervioso central (6.6%) entre otras localizaciones menos frecuentes. Así mismo se observó que 36 pacientes (20.1%) fallecieron, 6 de ellas por causas no relacionadas con el carcinoma de mama.

Tabla 19. Resultados clínico-patológicos

VARIABLES CLÍNICO-HISTOLÓGICAS		
n=179	FRECUENCIA (n)	PORCENTAJE (%)
EDAD		
< 40	21	11,7
40-65	108	60,4
> 65	50	27,9
TAMAÑO		
≤ 2cm	70	39,1
2,1-5cm	96	53,6
> 5cm	13	7,3
GRADO		
GI	31	17,3
GII	66	36,9
GIII	82	45,8
GANGLIOS		
N0	85	47,5
N1	48	26,8
N2	26	14,5
N3	12	6,7
Perdidos	8	4,5
RECIDIVA		
No recidiva	109	60,9
Local o Mx	34	19,0
Local y Mx	15	8,4
Perdidos	21	11,7

G: Grado, N: Estadificación de la afectación ganglionar según la clasificación TNM, Mx: Metástasis a distancia

4.2. RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

A partir de los resultados obtenidos de la expresión IHQ de RE, RP, Ki67 y la presencia o ausencia de amplificaciones de *HER2* detectadas mediante FISH, se realizó la subdivisión de la serie en grupos tumorales como ya ha sido descrito previamente en el apartado Materiales y Métodos. La distribución de las muestras según el grupo

tumoral fue: 68 casos (38%) se asignaron al grupo Luminal A, 63 casos (35.2%) al grupo Luminal B, 13 casos (7.3%) al grupo HER2 Sobreexpresado y 35 casos (19.5%) al grupo Triple Negativo.

Para el análisis estadístico, las variables RE, RP, Rb, p63, GCDFP-15 y GDF15 se dividieron según su valoración en dos grupos: Positivos y Negativos. Para los marcadores restantes se subdividió el grupo de positivos en expresión baja, intermedia y alta ó baja y alta según lo descrito en el apartado Materiales y Métodos.

La distribución de las muestras según la expresión de marcadores IHQ fue (Tabla 20):

- Todas las muestras (179) fueron positivas para el marcador CK19.
- E-cadherina: 13 casos (7.3%) resultaron negativos, 165 casos (92.2%) positivos y una de las muestras (0.5%) fue no valorable.
- Marcadores hormonales: **RE** (Figura 13): 50 casos (27.9%) fueron negativos y 129 casos (72.1%) positivos. **RP**: Encontramos 66 casos (36.9%) negativos y 113 casos (63.1%) positivos. **RA**: Se observó que 75 casos (41.9%) eran negativos, 57 casos (31.9%) eran positivos con baja expresión y 45 casos (25.1%) positivos con alta expresión. Dos casos fueron no valorables (1.1%)

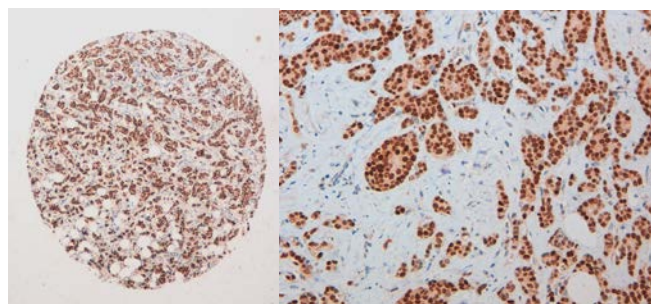


Figura 13. A: Cilindro de CIM (objetivo 5x) con sobreexpresión nuclear de RE. B: Detalle (20x) de la positividad nuclear para RE de un cilindro de CIM.

- Bcl2: Encontramos 41 casos (22.9%) negativos, 25 casos (14.0%) positivos con baja expresión y 113 casos (63.1%) positivos con alta expresión

Tabla 20. Distribución de los marcadores IHQ

DISTRIBUCIÓN DE LOS MARCADORES IHQ					
<i>n</i> =179	n	%		n	%
RE			p63		
Negativo	50	27,9	Negativo	164	91,6
Positivo	129	72,1	Positivo	15	8,4
RP			GCDFP-15		
Negativo	66	36,9	Negativo	139	77,7
Positivo	113	63,1	Positivo	40	22,3
Bcl2			AURKA		
Negativo	41	22,9	Negativo	147	82,1
Positivo Bajo	25	14,0	Positivo Bajo	27	15,1
Positivo Alto	113	63,1	Positivo Alto	5	2,8
RB			E-Cadherina		
Negativo	85	47,5	Negativo	13	7,3
Positivo	93	52,0	Positivo	165	92,2
Perdido	1	0,5	Perdido	1	0,5
P53			p16		
Negativo	95	53,1	Negativo	55	30,8
Positivo	45	25,1	Positivo Bajo	62	34,6
Positivo Alto	39	21,8	Positivo Alto	62	34,6
Her2			p21		
Negativo	142	79,3	Negativo	93	51,9
<i>Borderline</i>	17	9,5	Positivo Bajo	42	23,5
Positivo	20	11,2	Positivo Alto	44	24,6
RA			p27		
Negativo	75	41,9	Negativo	49	27,4
Positivo Bajo	57	31,9	Positivo Bajo	55	30,7
Positivo Alto	45	25,1	Positivo Alto	75	41,9
Perdido	2	1,1	GATA3		
Ki67			Negativo	13	7,3
Negativo	41	22,9	Positivo Bajo	8	4,5
Positivo Bajo	45	25,1	Positivo Medio	25	13,9
Positivo Alto	93	52,0	Positivo Alto	133	74,3
CCND1			FOXA1		
Negativo	33	18,4	Negativo	37	20,7
Positivo Bajo	52	29,1	Positivo Bajo	10	5,6
Positivo Alto	94	52,5	Positivo Medio	23	12,8
GDF15			Positivo Alto	109	60,9
Negativo	135	75,4	CK19		
Positivo	44	24,6	Positivo	179	100,0

- HER2 (Figura 14): 142 muestras tumorales (79.3%) fueron negativas, 17 muestras tumorales (9.5%) *Borderline* y 20 muestras tumorales (11.2%) positivas.

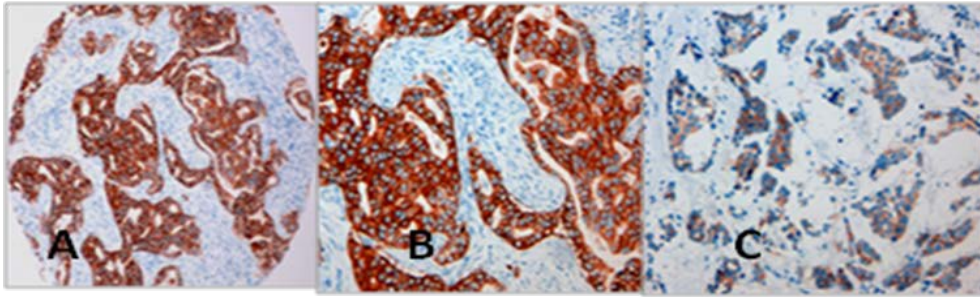


Figura 14. A y B: Cilindro de CIM con tinción IHQ positiva (3+) para HER2 a 5x y 20x respectivamente. C: Cilindro de CIM con tinción IHQ *borderline* (2+) para HER2 a 10X.

- Ki67 (Figura 15): Se valoraron como negativos 41 casos (22.9%), 45 casos (25.1%) presentaron baja proliferación celular y 93 casos (52.0%) alta proliferación.

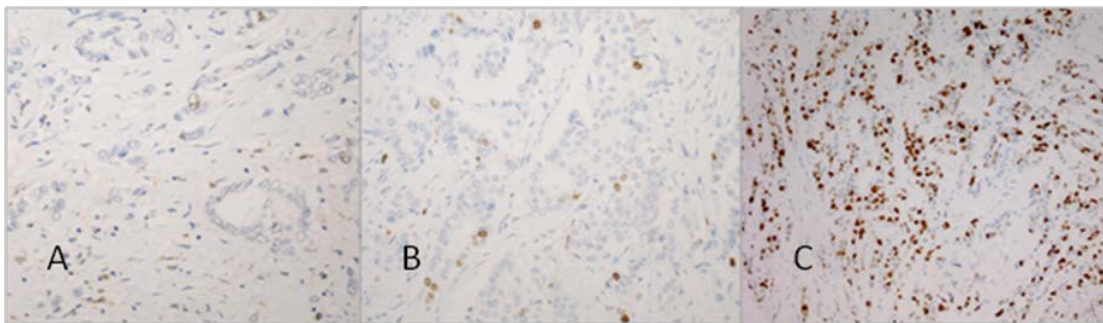


Figura 15. Expresión IHQ de Ki67 A: tinción nuclear menor del 3% (20x) B.: inmunotinción en menos del 14% de las células tumorales (20x) C: Alta proliferación determinada por inmunotinción nuclear en más del 14% de las células tumorales (10x)

- Proteínas supresoras tumorales: **p53** (Figura 16): 95 casos (53.1%) resultaron negativos, 45 casos (25.1%) positivos y 39 casos (21.8%) positivos altos; **Rb**: 85 casos fueron negativos (47.5%), 93 casos (52.0%) positivos y 1 caso (0.5%) no valorable.

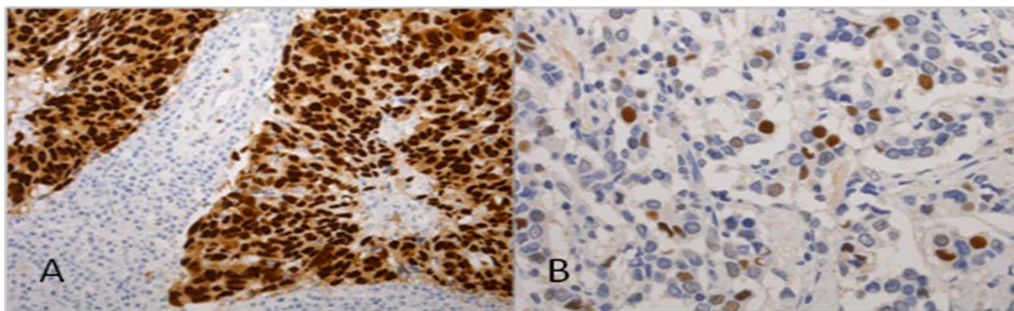


Figura 16. Inmunoexpresión de p53. A: sobreexpresión muy alta de p53 (objetivo de 20x). B: expresión de p53 en menos del 25% de las células tumorales, valorado como negativo (objetivo de 40x).

- Inhibidores de CDKs: **p16** (Figura 17): Observamos que 55 casos (30.8%) eran negativos, 62 casos (34.6%) positivos con expresión baja y 62 casos (34.6%) positivos con expresión alta; **p21** (Figura 18): encontramos 93 casos (51.9%) negativos, 42 casos (23.5%) positivos con expresión baja y 44 casos (24.6%) positivos con expresión alta; **p27** (Figura 19): 49 casos (27.4%) fueron negativos, 55 casos (30.7%) positivos con baja expresión y 75 casos (41.9%) positivos con alta expresión.

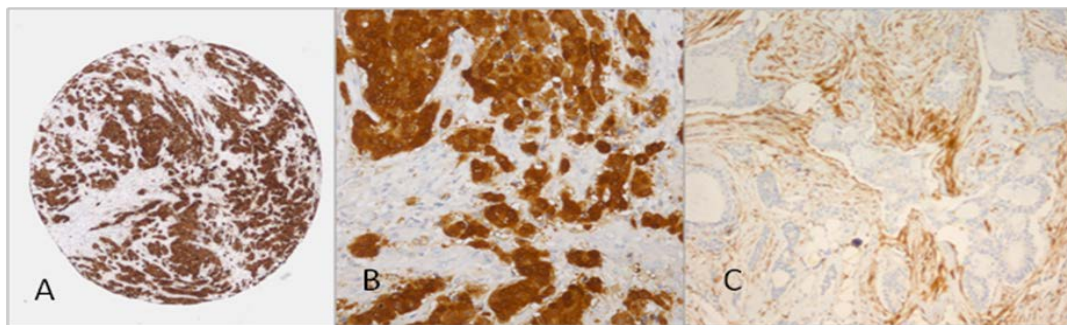


Figura 17. Valoración IHQ de p16. A: Cilindro de CIM con alta positividad para p16 (5x). B: Inmunotinción citoplasmática y nuclear para p16 (objetivo 20x) C: Muestra de CIM negativa para p16 con control interno (estroma) positivo.

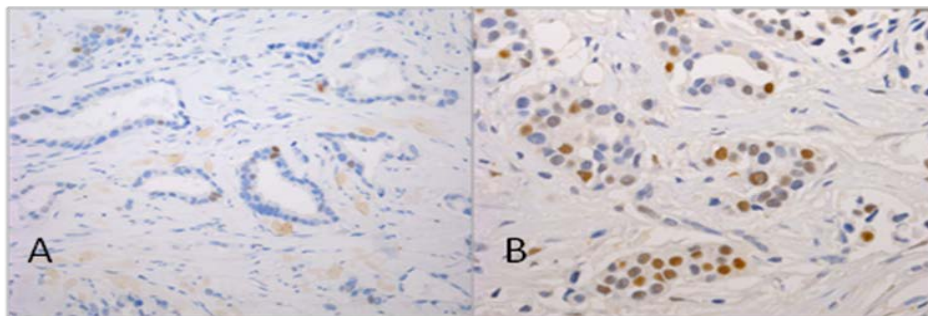


Figura 18. Expresión IHQ de p21. A: CIM con baja expresión nuclear para p21 con objetivo 20x; B: Visión a mayor aumento (objetivo 40x) CIM con alta expresión nuclear para p21.

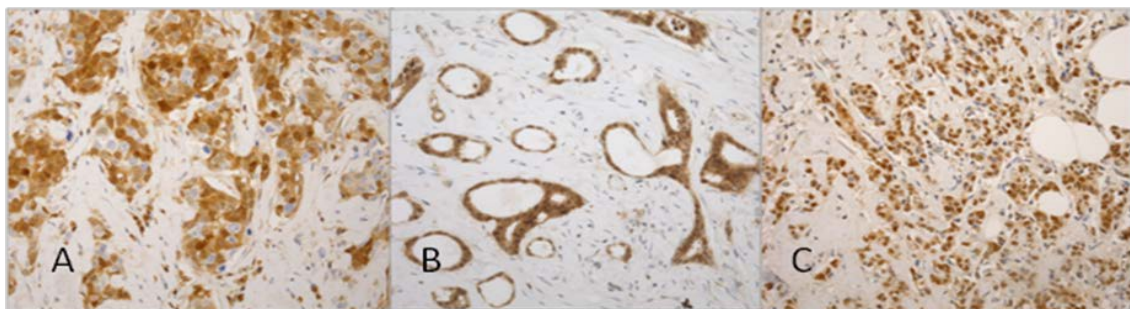


Figura 19. A: Muestra de CIM con positividad citoplasmática para p27 (foto tomada a 20x); B: CIM con alta expresión nuclear y citoplasmática para p27 (objetivo 20x); C: Cilindro de CIM con alta expresión nuclear para p27 foto tomada con objetivo 20x.

- Marcador de células basales/mioepiteliales: **p63** (Figura 20): 164 casos (91.6%) fueron negativos y 15 casos (8.4%) tuvieron expresión positiva en células tumorales.

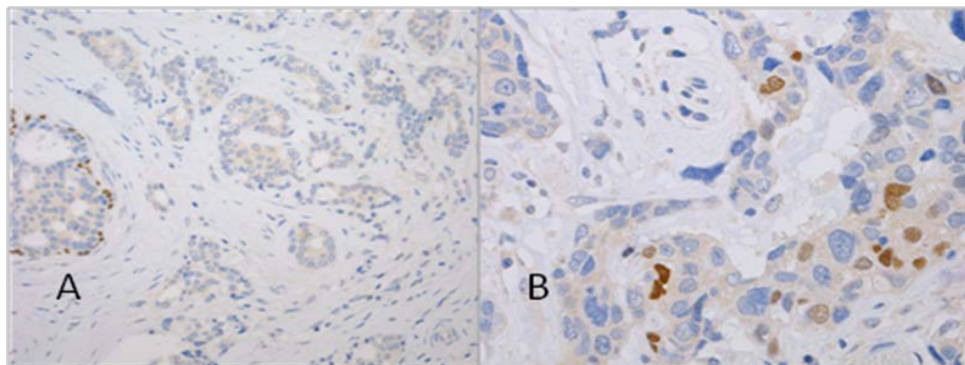


Figura 20. Inmunoexpresión de p63: A. Negativo en células tumorales, se observa el control interno positivo en las mioepiteliales de un islote de carcinoma *in situ* (foto tomada con objetivo 20x). B: Positivo en células tumorales (imagen a 40x)

- Factores de Transcripción: **FOXA1** (Figura 21) se observaron 37 casos (20.7%) negativos, 10 casos (5.6%) positivos con expresión baja, 23 casos (12.8%) positivos con expresión intermedia y 109 casos (60.9%) positivos con expresión alta. **GATA3** (Figura 22): 13 casos (7.3%) fueron negativos, 8 casos (4.5%) positivos con expresión baja, 25 casos (13.9%) positivos intermedios y 133 casos (74.3%) positivos con alta expresión.

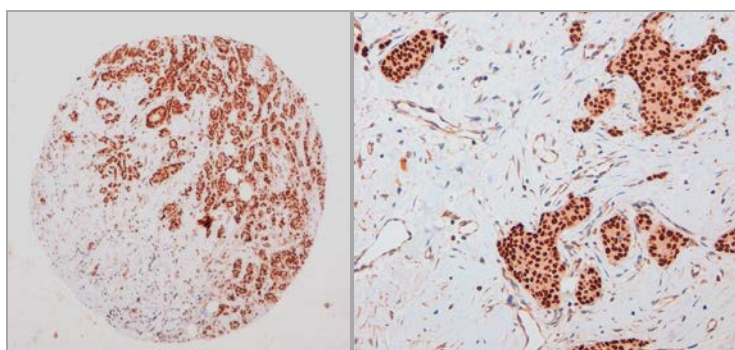


Figura 21. FOXA1. En el recuadro de la izquierda vista del cilindro de TMA (con lente 5x) con sobreexpresión de FOXA1, a la derecha a mayor aumento (20x) se identifica la tinción nuclear fuerte en células tumorales.

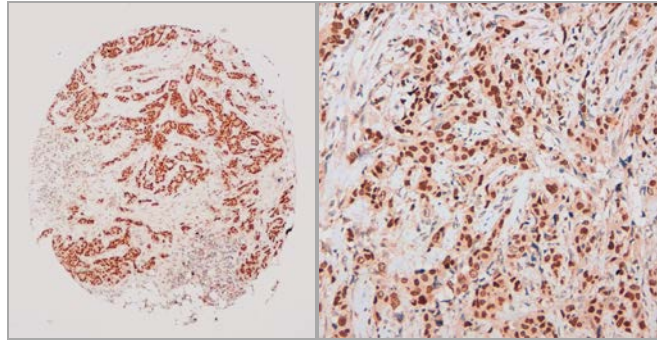


Figura 22. GATA3. En el recuadro de la izquierda vista panorámica a 5x del cilindro de TMA con sobreexpresión de GATA3, a la derecha a mayor aumento (40x) se observa patrón nuclear de tinción de la técnica IHQ.

- CCND1 (Figura 23): 33 muestras tumorales (18.4%) resultaron negativas, 52 muestras positivas (29.1%) con expresión baja y 94 (52.5%) muestras positivas con expresión alta.

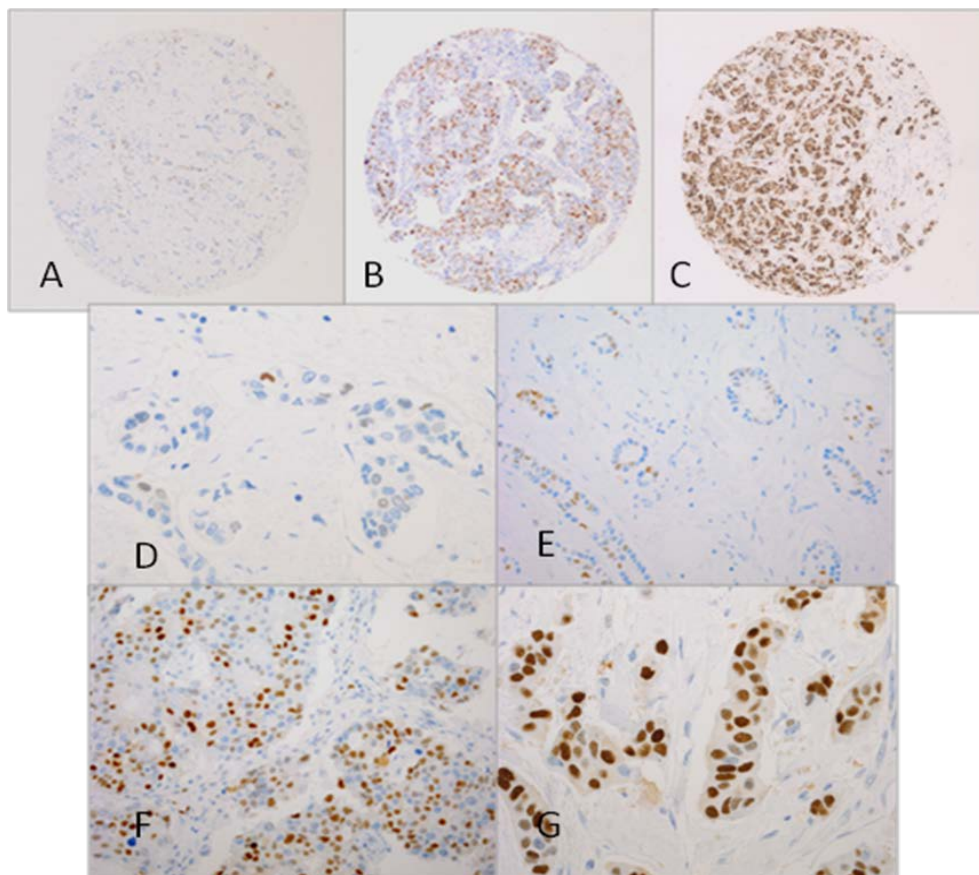


Figura 23. Inmunoexpresión de CCND1. A – C: Cilindros de CIM con objetivo 5x que muestran inmunoexpresión en menos 10%, del 25 al 50% y más del 50% de las células tumorales respectivamente. D: Valoración negativa para CCND1 con objetivo 20x (menos 10%) E y F: Baja expresión de CCND1 con objetivo 20x (10-25% y 25-50% respectivamente) G: Alta inmunoexpresión de CCND1 con objetivo 40x.

- Otros marcadores: **GCDFP-15** (Figura 24): Se encontraron 139 casos (77.7%) negativos y 40 casos (22.3%) positivos; **AURKA** (Figura 25): se observaron 147 casos (82.1%) negativos, 27 casos (15.1%) positivos con baja expresión y 5 casos (2.8%) positivos con alta expresión; **GDF15** (Figura 25): se valoraron 135 casos (75.4%) como negativos y 44 casos (24.6%) positivos.

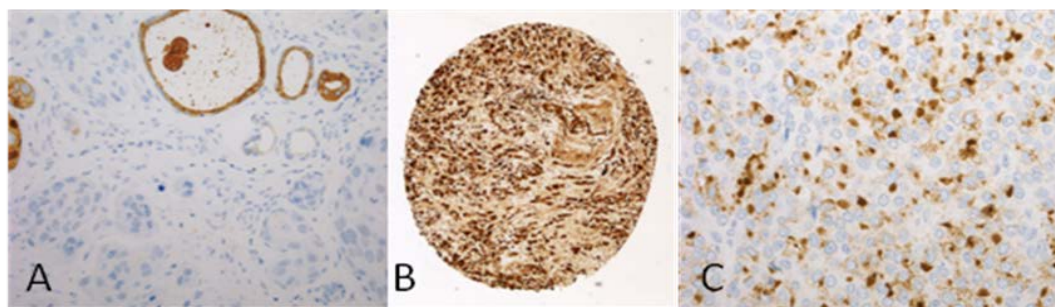


Figura 24. GCDFP-15. A: Cilindro de CIM con ausencia de expresión para GCDFP-15 y control interno positivo (20x); B: Vista panorámica (5x) de cilindro de CIM con sobreexpresión para GCDFP-15; C: CIM con positividad en forma de refuerzo paranuclear para GCDFP-15 (40X)

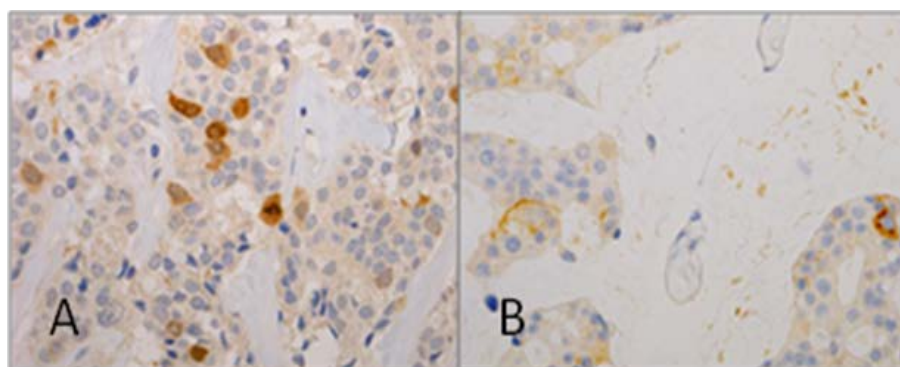


Figura 25. A: CIM con expresión citoplasmática para AURKA en menos del 20% de las células tumorales (foto tomada con objetivo 40x); B: Cilindro de CIM con expresión positiva para GDF15 (40X).

4.3. RESULTADOS DEL FISH

Los resultados obtenidos en la valoración del FISH para **CCND1** fueron: 145 casos (81%) no amplificados, 17 casos (9.5%) con amplificación baja (de 6-10 copias – Figura 26) y 17 casos (9.5%) con amplificación alta (más de 10 copias o madejas – Figura 27). En la evaluación del FISH de **HER2** se observaron 152 casos (84.9%) no amplificados y 27 casos (15.1%) amplificados (Figura 28).

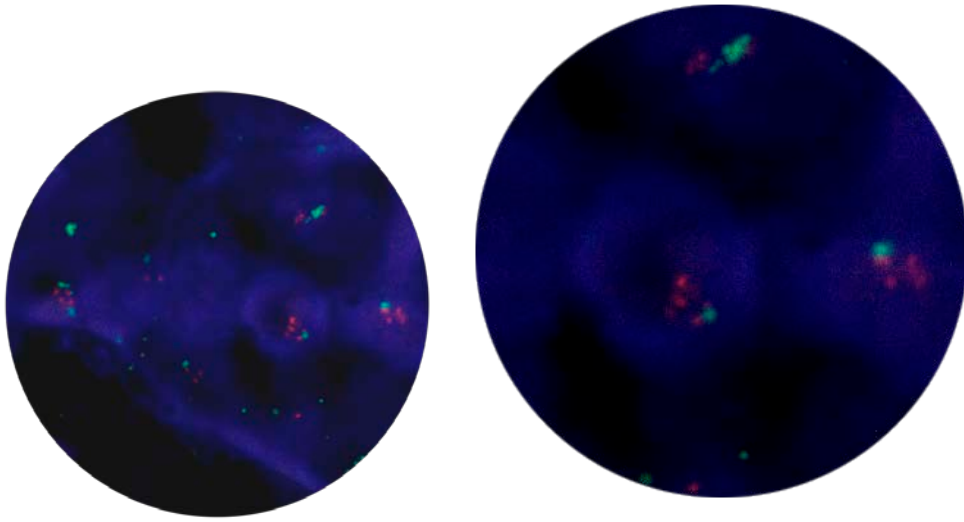


Figura 26. En la imagen de la izquierda observamos una amplificación baja (6-10 copias) de *CCND1* (60x) y a la derecha detalle celular a 100x. Las señales verdes corresponden con la señal centromérica y las señales rojas con el locus del gen *CCND1*.

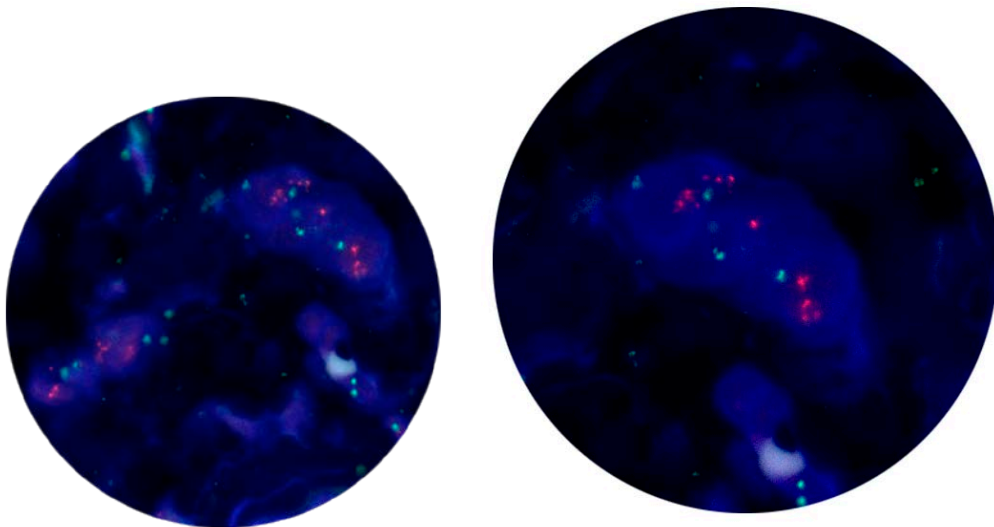


Figura 27. Amplificación alta de *CCND1* (Objetivo 60x en la imagen de la izquierda) con detalle de grupo celular en la imagen de la derecha (100x). Las señales verdes corresponden con la señal centromérica y las señales rojas con el locus del gen *CCND1*.

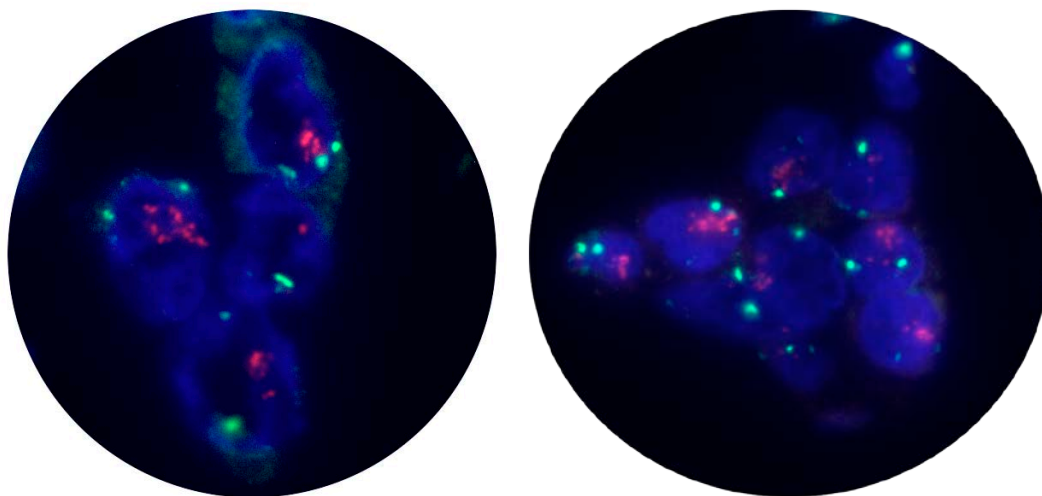


Figura 28. Hibridación *in situ* de *HER2*. Grupos celulares de CIM con amplificación de *HER2* (fotos tomadas con objetivo de 100x). Las señales verdes corresponden con la señal centromérica y las señales rojas con el locus del gen *HER2*.

4.4. RESULTADOS ESTADÍSTICOS

4.4.1. Parámetros clínico-patológicos

Dentro de los parámetros clínico-patológicos evaluados no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de **edad** de riesgo, el subtipo tumoral ($p=0,993$) ni tampoco con los marcadores IHQ estudiados en nuestra serie.

En el análisis del **tamaño tumoral** encontramos una tendencia estadística ($p=0.052$) entre el subtipo y el tamaño tumoral. Hasta el 50% de los casos pertenecientes al grupo Luminal A fueron tumores con tamaños menores de 2 cm (T1) y sólo el 5.9% fueron tumores con tamaños mayores a 5cm (T3). El grupo HER2 Sobreexpresado se asoció a los tamaños tumorales de 2 a 5 cm (T2), observándose que ningún caso del grupo HER2 Sobreexpresado presentó un tamaño mayor a 5cm (T3) y sólo 1 caso fue un T1. Respecto a los grupos Luminal B y Triple Negativo la distribución de los casos fue mayoritariamente en los tamaños T1 y T2. Seis de los trece casos con tumores T3 pertenecían al grupo Luminal B (Tabla 21).

Se observó una asociación significativa entre el tamaño tumoral y la expresión de p27 ($p=0.003$) (Tabla 22); los tumores de tamaño mayor a 5cm (T3) se asociaron con la alta expresión de p27. No se encontraron diferencias significativas entre el tamaño tumoral y el resto de los marcadores IHQ incluidos en el estudio estadístico.

Tabla 21. Correlación de los grupos tumorales con la edad y el tamaño tumoral

CORRELACION DE LOS GRUPOS TUMORALES CON LOS GRUPOS DE EDAD Y TAMAÑO TUMORAL								
	EDAD				TAMAÑO			
	< 40 años	41-60 años	>60 años	<i>p</i>	T1	T2	T3	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	n (%)	
LUMINAL A	7 (10,3)	41 (60,3)	20 (29,4)	0,993	34 (50,0)	30 (44,1)	4 (5,9)	0,052
LUMINAL B	7 (11,1)	39 (61,9)	17 (27,0)		21 (33,3)	36 (57,2)	6 (9,5)	
HER2 SOBREEXP.	2 (15,4)	7 (53,8)	4 (30,8)		1 (7,7)	12 (92,3)	0 (0,0)	
TRIPLE NEG.	5 (14,3)	21 (60,0)	9 (25,7)		14 (40,0)	18 (51,4)	3 (8,6)	

Tabla 22. Correlación del tamaño tumoral con la expresión de p27

CORRELACIÓN ENTRE EL TAMAÑO TUMORAL Y LA EXPRESIÓN DE p27				
	p27 Negativo n (%)	p27 bajo n (%)	p27 alto n (%)	<i>P</i>
T1	12 (17,1)	21 (30,0)	37 (52,9)	0,003
T2	36 (37,5)	31 (32,3)	29 (30,2)	
T3	1 (7,7)	3 (23,1)	9 (69,2)	

El **grado histológico** y la **afectación ganglionar** se asociaron significativamente con el grupo tumoral ($p<0.001$ y $p=0.002$ respectivamente) (Tabla 23). Respecto al grado histológico, también encontramos una asociación significativa con la expresión IHQ de RE ($p<0.001$), RP ($p<0.001$), Ki67 ($p<0.001$), CCND1 ($p=0.002$), FOXA1 ($p=0.008$), Bcl2 ($p<0.001$), p53 ($p<0.001$), p16 ($p=0.003$), p27 ($p<0.001$) y AURKA ($p<0.001$), y además con los resultados del FISH para *HER2* ($p<0.001$) y *CCND1* ($p<0.001$). En cuanto a la afectación ganglionar, la significancia estadística se observó en la correlación con RE ($p<0.001$), RP ($p<0.001$), CCND1 ($p=0.012$), Bcl2 ($p=0.007$), p27 ($p<0.001$), GATA3 ($p=0.023$) y con el FISH para *HER2* ($p=0.041$).

Los grupos tumorales HER2 Sobreexpresado y Triple Negativo mostraron asociación con los altos grados histológicos (GIII), mientras que el grupo Luminal A se

asoció con los tumores moderadamente diferenciados (GII). Además se observó que el 71% de los tumores clasificados en nuestra serie como grado I (22 casos de 31) pertenecían al subtipo Luminal A. El grupo Luminal B se distribuyó de manera casi homogénea en los grados histológicos II y III (41,3% y 46,0% respectivamente) con tan sólo 12.7% de los tumores Luminales B de la serie con grado histológico I (Tabla 23).

Tabla 23. Correlación de los grupos tumorales con el grado histológico y la afectación ganglionar según la clasificación TNM

CORRELACION DE LOS GRUPOS TUMORALES CON EL GRADO HISTOLÓGICO Y LA AFECTACIÓN GANGLIONAR									
	GRADO				GANGLIOS				P
	GI	GII	GIII	P	N0	N1	N2	N3	
	n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
LUMINAL A	22 (32,4)	34 (50,0)	12 (17,6)	<0,001	34 (53,1)	21 (32,8)	8 (12,5)	1 (1,6)	0,002
LUMINAL B	8 (12,7)	26 (41,3)	29 (46,0)		25 (41,0)	22 (36,0)	10 (16,4)	4 (6,6)	
HER2 SOBREEXP.	0 (0,0)	2 (15,4)	11 (84,6)		7 (58,4)	1 (8,3)	0 (0,0)	4 (33,3)	
TRIPLE NEG	1 (2,9)	4 (11,4)	30 (85,7)		19 (55,9)	4 (11,8)	8 (23,5)	3 (8,8)	

El grupo Luminal A se asoció con la ausencia de afectación ganglionar (N0) con sólo 1 caso de este grupo clasificado como N3. Dentro del grupo N3 encontramos que los casos se distribuían entre los subtipos Luminal B, HER2 Sobreexpresado y Triple Negativo (Tabla 23).

En el análisis estadístico de grado histológico en relación a la expresión de los marcadores IHQ se encontró que los tumores bien y moderadamente diferenciados (Grados I y II) se asociaban con la expresión positiva de RE y RP, con alta expresión de CCND1, FOXA1, Bcl2 y p27 (Tablas 24, 25 y 27).

También se observó correlación de los GI y GII con las valoraciones negativas de p53 (Tabla 25). Los tumores mejor diferenciados (GI) mostraron una asociación significativa con la negatividad de p16 y la ausencia de amplificaciones tanto de *HER2* ($p<0.001$) como *CCND1* ($p=0.038$) (Tablas 26 – 28). Todos los tumores clasificados como grado I resultaron negativos en el estudio de HER2 (IHQ y FISH) (Tabla 28).

Tabla 24. Correlación de grado histológico y afectación ganglionar con RE, RP, Bcl2 y CCND1.

CORRELACIÓN DEL GRADO HISTOLÓGICO Y LA AFECTACIÓN GANGLIONAR CON LA EXPRESIÓN DE RE, RP, Bcl2, Y CCND1							
GRADO	RE		<i>p</i>	Bcl2			<i>p</i>
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
GI	1 (3,2)	30 (96,8)	< 0,001	2 (6,5)	2 (6,5)	27 (87,0)	< 0,001
GII	7 (10,6)	69 (89,4)		9 (13,6)	3 (4,6)	54 (81,8)	
GIII	42 (51,2)	40 (48,8)		30 (36,6)	20 (24,4)	32 (39,0)	
GANGLIOS			0,007				0,007
N0	26 (30,6)	59 (69,4)		19 (22,3)	13 (15,3)	53 (62,4)	
N1	6 (12,5)	42 (87,5)		7 (14,6)	4 (8,3)	37 (77,1)	
N2	9 (34,6)	17 (65,4)		6 (23,1)	5 (19,2)	15 (57,7)	
N3	7 (58,3)	5 (41,7)		8 (66,7)	1 (8,3)	3 (25,0)	
GRADO	RP		<i>p</i>	CCND1			<i>p</i>
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
GI	4 (12,9)	27 (87,1)	< 0,001	2 (6,5)	12 (38,7)	17 (54,8)	0,002
GII	13 (19,7)	53 (80,3)		9 (13,6)	12 (18,2)	45 (68,2)	
GIII	49 (59,8)	33 (40,2)		22 (26,8)	28 (34,2)	32 (39,0)	
GANGLIOS			0,001				0,012
N0	35 (41,2)	50 (58,8)		20 (23,5)	29 (34,1)	36 (42,4)	
N1	8 (16,7)	40 (83,3)		5 (10,4)	9 (18,8)	34 (70,8)	
N2	9 (34,6)	17 (65,4)		3 (11,5)	7 (26,9)	16 (61,6)	
N3	9 (75,0)	3 (25,0)		5 (41,7)	4 (33,3)	3 (25,0)	

Tabla 25. Correlación del grado histológico con la expresión de Ki67, p53, FOXA1 y AURKA

CORRELACIÓN DEL GRADO HISTOLÓGICO CON LA EXPRESIÓN DE Ki67, p53, FOXA1 y AURKA								
GRADO	Ki67			<i>p</i>	p53			<i>p</i>
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
GI	13 (41,9)	10 (32,3)	8 (25,8)	<0,001	19 (61,3)	11 (35,5)	1 (3,2)	< 0,001
GII	15 (22,7)	26 (39,4)	25 (37,9)		45 (68,2)	16 (24,2)	5 (7,6)	
GIII	13 (15,8)	9 (11,0)	60 (73,2)		31 (37,8)	18 (22,0)	33 (40,2)	
GRADO	FOXA1						<i>p</i>	
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)				
GI	5 (16,1)	1 (3,2)	4 (12,9)	21 (67,8)	0,008			
GII	5 (7,6)	3 (4,6)	9 (13,6)	49 (74,2)				
GIII	27 (32,9)	6 (7,3)	10 (12,2)	39 (47,6)				
GRADO	AURKA			<i>p</i>				
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)					
GI	29 (93,5)	0 (0,0)	2 (6,5)	< 0,001				
GII	61 (92,4)	3 (4,6)	2 (3,0)					
GIII	57 (69,5)	24 (29,3)	1 (1,2)					

Respecto a los tumores con grado histológico alto (GIII) se correlacionaron con la negatividad para RP y con la alta expresión positiva para Ki67, p16, y p53 (Tablas 24, 25 y 27). Adicionalmente se observó que la mayor parte de las valoraciones negativas de RE (42 de 50 - 84%), RP (49 de 66 - 74.2%), CCND1 (22 de 33 - 66.7%), FOXA1 (27 de 37 - 73.0%), Bcl2 (30 de 41 - 73.2%) y p27 (33 de 49 - 67.3%), así como la mayoría de las positivas de AURKA (25 de 32 - 78.1%) eran a su vez tumores GIII (Tablas 24 y 27).

Tabla 26. Correlación del grado histológico con el FISH para *CCND1* y con la expresión de GCDFP-15

CORRELACIÓN DEL GRADO HISTOLÓGICO CON EL FISH PARA <i>CCND1</i> Y LA EXPRESIÓN DE GCDFP15							
GRADO	FISH para <i>CCND1</i>			<i>p</i>	GCDFP-15		<i>p</i>
	Ausencia de Amplificación n (%)	Amplificado Bajo n (%)	Amplificado Alto n (%)		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
GI	27 (87,0)	2 (6,5)	2 (6,5)	0,038	20 (64,5)	11 (35,5)	0,02
GII	47 (71,2)	12 (18,2)	7 (10,6)		48 (72,7)	18 (27,3)	
GIII	71 (86,6)	3 (3,6)	8 (9,8)		71 (86,6)	11 (13,4)	

Tabla 27. Correlación del grado histológico y la afectación ganglionar con la expresión de Ki67, p53, p16 y p27.

CORRELACIÓN DEL GRADO HISTOLÓGICO Y AFECTACIÓN GANGLIONAR CON LA EXPRESIÓN DE p16 y p27								
	p16			<i>p</i>	p27			<i>p</i>
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Grado				0,003				< 0,001
GI	15 (48,3)	12 (38,7)	4 (12,9)		4 (12,9)	7 (22,6)	20 (64,5)	
GII	15 (22,7)	30 (45,5)	21 (31,8)		12 (18,2)	18 (27,3)	36 (54,5)	
GIII	25 (30,5)	20 (24,4)	37 (45,1)		33 (40,2)	30 (36,6)	19 (23,2)	
Ganglios				0,904				0,001
N0	26 (30,6)	29 (34,1)	30 (35,3)		25 (29,4)	29 (34,1)	31 (36,5)	
N1	15 (31,2)	20 (41,7)	13 (27,1)		5 (10,4)	15 (31,3)	28 (58,3)	
N2	7 (26,9)	9 (34,6)	10 (38,5)		9 (34,6)	6 (23,1)	11 (42,3)	
N3	4 (33,3)	3 (25,0)	5 (41,7)		9 (75,0)	2 (16,7)	1 (8,3)	

Este grupo de tumores GIII también contenía el mayor número valoraciones positivas de HER2 (17 de 20 - 85,0%) al igual que la mayor parte de amplificaciones de *HER2* (22 de 27 - 81.5%) (Tabla 28). Encontramos que a mayor grado histológico la expresión de GCDFP-15 iba disminuyendo (Tabla 26). No se encontraron asociaciones

significativas en la correlación estadística del grado histológico con los marcadores RA, p63, Rb, GATA3, p21, GDF15 ni AURKA.

Respecto a la estadificación de la afectación ganglionar se observó asociación de los casos N3 con la negatividad para RE, RP, Bcl2, CCND1 y p27 (Tablas 24 y 27). Inversamente los casos con menor afectación ganglionar (N0, N1 y N2) se distribuyeron mayoritariamente en los grupos de expresión positiva para RE y RP y expresión positiva alta para Bcl2, CCND1 y p27 (Tablas 24 y 27).

Tabla 28. Correlación del grado histológico y la afectación ganglionar con la presencia de amplificaciones de *HER2* y la expresión IHQ de *HER2*.

CORRELACIÓN DEL GRADO HISTOLÓGICO Y LA AFECTACIÓN GANGLIONAR CON LAS AMPLIFICACIONES DE <i>HER2</i> Y LA EXPRESIÓN IHQ DE <i>HER2</i>							
	FISH para <i>HER2</i>		<i>p</i>	HER2 IHQ			<i>p</i>
	Ausencia de Amplificación n (%)	Amplificado n (%)		Negativo n (%)	<i>Borderline</i> n (%)	Positivo n (%)	
Grado			< 0,001				0,002
GI	31 (100,0)	0 (0,0)		30 (96,8)	1 (3,2)	0 (0,0)	
GII	61 (92,4)	5 (7,6)		54 (81,8)	9 (13,6)	3 (4,6)	
GIII	60 (73,2)	22 (26,8)		58 (70,7)	7 (8,6)	17 (20,7)	
Ganglios			0,041				0,587
N0	72 (84,7)	13 (15,3)		68 (80,0)	8 (9,4)	9 (10,6)	
N1	44 (91,7)	4 (8,3)		41 (85,4)	3 (6,3)	4 (8,3)	
N2	22 (84,6)	4 (15,4)		20 (77,0)	3 (11,5)	3 (11,5)	
N3	7 (58,3)	5 (41,7)		7 (58,3)	2 (16,7)	3 (25,0)	

Tabla 29. Correlación de la afectación ganglionar con GATA3.

CORRELACIÓN DE LA AFECTACIÓN GANGLIONAR SEGÚN LA EXPRESIÓN DE GATA3					
GANGLIOS	GATA3				<i>P</i>
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)	
N0	4 (4,7)	5 (5,9)	11 (12,9)	65 (76,5)	0,023
N1	1 (2,1)	2 (4,2)	6 (12,5)	39 (81,3)	
N2	3 (11,5)	1 (3,8)	6 (23,1)	16 (61,5)	
N3	4 (33,3)	0 (0,0)	2 (16,7)	6 (50,0)	

También observamos que en el grupo de casos N3 aproximadamente el 40% de estos tumores tenían amplificaciones del *HER2* (Tabla 28). Todos los grados de afectación ganglionar presentaron una alta expresión de GATA3 con una mayor distribución de los casos GATA3 positivos altos en los grupos N0 y N1 (Tabla 29). No

se encontraron asociaciones significativas entre la afectación ganglionar y RA, HER2, Ki67, FOXA1, Rb, p53, p63, p16, p21, AURKA, GCDFP-15 ni GDF15.

4.4.2. Subtipos tumorales

Para el análisis estadístico de los cuatro subtipos tumorales previamente designados como Luminal A, Luminal B, HER2 Sobreexpresado y Triple Negativo, se estudió la correlación de estos grupos con los marcadores IHQ: RA, p63, p53, Bcl2, Rb, CCND1, FOXA1, GATA3, p16, p21, p27, GCDFP-15, AURKA y GDF15. Los resultados obtenidos de las valoraciones de la técnica de FISH para *CCND1* también se analizaron en relación a los cuatro grupos.

Dentro del subtipo Luminal B se encontró que un 22% de los casos portaban amplificaciones del gen *HER2*. Identificamos que el subtipo Luminal A y Triple Negativo se correlacionaron con las valoraciones negativas de HER2, mostrando además, que ningún tumor Luminal A ni Triple Negativo fue positivo (valoración 3) para la expresión de HER2. Las valoraciones *Borderline* se distribuyeron en todos los subtipos con una mayor representación en el subtipo Luminal B. En nuestra serie obtuvimos dos casos del subtipo HER2 Sobreexpresado que no mostraron expresión IHQ de HER2 pero que eran portadores de la amplificación genética, esto es probable que se deba a errores en la técnica de tinción IHQ o de la fijación de la pieza (Tabla 30).

Tabla 30. Distribución de los grupos tumorales en los grupos de expresión de HER2 y el FISH para *HER2*

DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS TUMORALES EN LOS GRUPOS DE EXPRESIÓN DE HER2 Y EL FISH PARA <i>HER2</i>					
n=179	HER2			FISH para <i>HER2</i>	
	Negativo n (%)	<i>Borderline</i> n (%)	Positivo n (%)	No Amplificado	Amplificado
LUMINAL A	65 (95,6)	3 (4,4)	0 (0,0)	68 (100,0)	0 (0,0)
LUMINAL B	41 (65,1)	11 (17,5)	11 (17,5)	49 (77,8)	14 (22,2)
HER2	2 (15,4)	2 (15,4)	9 (69,2)	0 (0,0)	13 (100,0)
TRIPLE NEG	34 (97,1)	1 (2,9)	0 (0,0)	35 (100,0)	0 (0,0)

El marcador de proliferación celular Ki67 fue utilizado como punto de corte para la identificación y clasificación de los tumores Luminales A y Luminales B. El análisis de su comportamiento en el resto de los grupos (HER2 Sobreexpresado y Triple

Negativo) evidenció que ambos grupos presentaban en la mayoría de sus casos altos niveles de Ki67 (Tabla 31).

Tabla 31. Distribución de los grupos tumorales en los grupos de niveles de Ki67

DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS TUMORALES EN LOS NIVELES DE Ki67			
n=179	Ki67		
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)
LUMINAL A	30 (44,1)	38 (55,9)	0 (0,0)
LUMINAL B	2 (3,2)	3 (4,8)	58 (92,1)
HER2	2 (15,4)	3 (23,1)	8 (61,5)
TRIPLE NEG	7 (20,0)	1 (2,9)	27 (77,1)

Para la mejor caracterización de los subgrupos tumorales analizamos la correlación de Ki67 con la expresión de la proteína HER2 y la presencia o ausencia de amplificaciones del gen *HER2*. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de Ki67 y la expresión de la proteína HER2 ($p=0.004$): los niveles $<3\%$ de Ki67 se asocian con la negatividad para HER2. Un 80% de los casos positivos (valoración 3) para HER2 se asociaron a tumores con altos niveles de Ki67 ($>14\%$). No se encontraron diferencias significativas en el estudio de la relación Ki67 con la amplificación de *HER2* (FISH) (Tabla 32).

Tabla 32. Correlación de los índices de Ki67 (proliferación celular) con la expresión IHQ de HER2 y la presencia de amplificaciones de *HER2*.

CORRELACIÓN DE LOS ÍNDICES DE Ki67 CON LA EXPRESIÓN DE HER2 Y LAS AMPLIFICACIONES DE <i>HER2</i>							
	FISH para <i>HER2</i>		<i>p</i>	HER2 IHQ			<i>p</i>
	Ausencia de Amplificación n (%)	Amplificado n (%)		Negativo n (%)	<i>Borderline</i> n (%)	Positivo Alto n (%)	
Ki67			0,415				0,04
Negativo	37 (90,2)	4 (9,8)		38 (92,7)	2 (4,9)	1 (2,4)	
Positivo Bajo	39 (86,7)	6 (13,3)		38 (84,4)	4 (8,9)	3 (6,7)	
Positivo Alto	76 (81,7)	17 (18,3)		66 (71,0)	11 (11,8)	16 (17,2)	

Con el fin de valorar más objetivamente las diferencias entre el subtipo Luminal A y Luminal B se analizó la relación entre la expresión de RE y RP con Ki67, encontrando asociación significativa entre estos marcadores ($p=0.002$ y $p=0.044$).

respectivamente). Observamos que la negatividad para RE y RP se correlacionó con alta proliferación (Ki67 >14%) (Tabla 33).

Tabla 33. Correlación entre la expresión de RE y RP con la expresión de Ki67

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE RE Y RP CON EL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN Ki67				
	Ki67			p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
RE				0,002
Negativo	9 (18,0)	5 (10,0)	36 (72,0)	
Positivo	32 (24,8)	40 (31,0)	57 (44,2)	
RP				0,044
Negativo	15 (22,7)	10 (15,2)	41 (62,1)	
Positivo	26 (23,0)	35 (31,0)	52 (46,0)	

Los subtipos tumorales mostraron una asociación estadísticamente significativa con p63 (p=0.009), Rb (p=0.002), p53 (p<0.001), FOXA1 (p<0.001), GATA3 (p<0.001), p16 (p=0.001), Bcl2 (p<0.001), RA (p<0,001), p27 (<0.001) AURKA (p<0.001) y CCND1 (p<0.001), así como con los resultados del FISH para *CCND1* (p=0.002) (Tablas 34 – 36).

Respecto a p63, encontramos que la frecuencia de expresión positiva para este marcador en nuestra serie era muy baja (15 casos de 179). Dentro de los grupos tumorales, el subtipo tumoral HER2 Sobreexpresado era el que mostraba con mayor frecuencia positividad para p63, con un 30% de tumores p63 positivo, mientras que en el resto de los grupos tumorales la expresión de p63 se detectó en menos del 12% de los casos (Tabla 34).

Los subtipos Luminal A y Luminal B se asociaron a la alta positividad para FOXA1, GATA3, Bcl2, CCND1 y p27 (Tabla 34 y 36). Adicionalmente el subtipo Luminal A se correlacionó con la negatividad de Rb y p53, mientras que en el grupo Luminal B encontramos un 70% y un 50% de positividad para Rb y p53 respectivamente (Tabla 34).

El subtipo de tumores HER2 Sobreexpresado se correlacionó con la negatividad para p53, Bcl2 y p27 y con la positividad para Rb (Tablas 34 y 36). Finalmente observamos que el grupo Triple Negativo se asoció con la valoración negativa de

FOXA1, RA, CCND1 y p27 y la alta positividad de p53 y p16 (Tablas 34 y 36). A pesar de la expresión de GATA3 en todos los subtipos, los casos GATA3 negativos se distribuyeron principalmente en los subtipos HER2 y Triple Negativo (Tabla 34). Respecto a AURKA observamos que las valoraciones positivas (>20% de las células) se distribuyeron en los subtipos Luminal B y Triple Negativo (Tabla 36).

Tabla 34. Correlación de los grupos tumorales con la expresión de p63, Rb, FOXA1, GATA3, p53 y p16

CORRELACIÓN DE LOS GRUPOS TUMORALES CON LA EXPRESIÓN DE p63, Rb, FOXA1, GATA3, p53 y p16								
	p63 n=179		p	FOXA1 n=179				p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)	
LUMINAL A	66 (97,1)	2 (2,9)	0,009	5 (7,4)	2 (2,9)	8 (11,8)	53 (77,9)	< 0,001
LUMINAL B	58 (92,1)	5 (7,9)		3 (4,7)	2 (3,2)	10 (15,9)	48 (76,2)	
HER2	9 (69,2)	4 (30,8)		3 (23,1)	2 (15,4)	3 (23,1)	5 (38,4)	
TRIPLE NEG.	31 (88,6)	4 (11,4)		26 (74,3)	4 (11,4)	2 (5,7)	3 (8,6)	
	Rb n=178		p	GATA3 n=179				p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)	
LUMINAL A	42 (61,8)	26 (38,2)	0,002	3 (4,4)	2 (2,9)	8 (11,8)	55 (80,9)	< 0,001
LUMINAL B	19 (30,2)	44 (69,8)		1 (1,6)	1 (1,6)	3 (4,8)	58 (92,0)	
HER2	5 (38,5)	8 (61,5)		3 (23,1)	1 (7,7)	3 (23,1)	6 (46,1)	
TRIPLE NEG.	19 (55,9)	15 (44,1)		6 (17,2)	4 (11,4)	11 (31,4)	14 (40)	
	p53 n=179			p	p16 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
LUMINAL A	47 (69,1)	20 (29,4)	1 (1,5)	< 0,001	26 (38,2)	28 (41,2)	14 (20,6)	0,001
LUMINAL B	33 (52,4)	16 (25,4)	14 (22,2)		16 (25,4)	26 (41,3)	21 (33,3)	
HER2	7 (53,8)	3 (23,1)	3 (23,1)		5 (38,4)	4 (30,8)	4 (30,8)	
TRIPLE NEG.	8 (22,9)	6 (17,1)	21 (66,0)		8 (22,9)	4 (11,4)	23 (65,7)	

Tabla 35. Correlación entre los grupos tumorales y los resultados del FISH para *CCND1*

CORRELACIÓN ENTRE LOS GRUPOS TUMORALES Y LOS RESULTADOS DEL FISH PARA <i>CCND1</i>				
	FISH para <i>CCND1</i>			p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
n=179				
LUMINAL A	56 (82,3)	11 (16,2)	1 (1,5)	0,002
LUMINAL B	45 (71,4)	5 (8,0)	13 (20,6)	
HER2 SOBREEEXP.	12 (92,3)	0 (0,0)	1 (7,7)	
TRIPLE NEGATIVO	32 (91,4)	1 (2,9)	2 (5,7)	

Así mismo se encontró una asociación entre los subtipos HER2 Sobreexpresado y Triple Negativo con la ausencia de amplificaciones de *CCND1*. Las amplificaciones de *CCND1* se distribuyeron mayoritariamente en los grupos luminales, observándose que el 68% (11 casos de 17) de las amplificaciones bajas eran tumores del subtipo A y el 76% (13 casos de 17) de las amplificaciones altas eran tumores del subtipo B (Tabla 35).

Tabla 36. Correlación de los grupos tumorales con la expresión de Bcl2, RA, p27, CCND1 y AURKA

CORRELACIÓN DE LOS GRUPOS TUMORALES CON LA EXPRESIÓN IHQ DE Bcl2, RA, p27, CCND1 Y AURKA								
	Bcl2 n=179			p	RA n=177			p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
LUMINAL A	5 (7,4)	2 (2,9)	61 (89,7)	<0,001	22 (32,4)	24 (35,2)	22 (32,4)	<0,001
LUMINAL B	9 (14,3)	8 (12,7)	46 (73,0)		17 (27,9)	24 (39,3)	20 (32,8)	
HER2	12 (92,3)	1 (7,7)	0 (0,0)		7 (53,8)	4 (30,8)	2 (15,4)	
TRIPLE NEG	15 (42,9)	14 (40,0)	6 (17,1)		29 (82,9)	5 (14,3)	1 (2,8)	
	p27 n=179			p	CCND1 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
LUMINAL A	9 (13,2)	18 (26,5)	41 (60,3)	<0,001	5 (7,3)	22 (32,4)	41 (60,3)	<0,001
LUMINAL B	11 (17,5)	21 (33,3)	31 (49,2)		3 (4,8)	15 (23,8)	45 (71,4)	
HER2	9 (69,2)	4 (30,8)	0 (0,0)		4 (30,8)	5 (38,4)	4 (30,8)	
TRIPLE NEG	20 (57,1)	12 (34,3)	3 (8,6)		21 (60,0)	10 (28,6)	4 (11,4)	
	AURKA			P				P
	Negativo n (%)		Positivo Bajo n (%)		Positivo Alto n (%)			
LUMINAL A	64 (94,1)		0 (0,0)	4 (5,9)	< 0,001			
LUMINAL B	52 (82,5)		11 (17,5)	0 (0,0)				
HER2	10 (76,9)		3 (23,1)	0 (0,0)				
TRIPLE NEG	21 (60,0)		13 (37,1)	1 (2,9)				

Las correlaciones entre los grupos tumorales y los marcadores p21, AURKA, GCDFP-15 y GDF15 no mostraron significancia estadística.

4.4.3. FISH vs IHQ

En el análisis de la correlación entre la IHQ y los resultados del FISH de *CCND1* encontramos que las valoraciones negativas se correlacionan con la ausencia de amplificaciones ($p=0.003$), resaltando que ningún caso con valoración IHQ negativa presentó alta amplificación. La alta amplificación se correlaciona con alta expresión de

la proteína, existiendo sin embargo, un 70,2% de casos (66 de 94) con alta expresión de la proteína en ausencia de amplificación del gen, mostrando que la proteína se sobreexpresa por otras vías diferentes a la amplificación genética (Tabla 37).

Tabla 37. Correlación entre de los resultados del FISH y la IHQ para CCND1

CORRELACIÓN ENTRE EL FISH PARA CCND1 Y LA IHQ PARA CCND1				
FISH para CCND1	CCND1 IHQ			p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
No Amplificado	31 (21,4)	48 (33,1)	66 (45,5)	0,003
Amplificado Bajo	2 (11,8)	2 (11,8)	13 (76,4)	
Amplificado Alto	0 (0,0)	2 (11,8)	15 (88,2)	

El análisis de los resultados de la correlación entre el FISH de *CCND1* con los marcadores IHQ no mostró diferencias significativas, a excepción de la asociación entre la presencia de altas amplificaciones y tumores con altos niveles de Ki67 ($p=0.007$) (Tabla 38).

Tabla 38. Correlación entre el FISH para *CCND1* y la expresión IHQ de Ki67

CORRELACIÓN ENTRE EL FISH PARA CCND1 Y LA EXPRESIÓN DE Ki67				
FISH para CCND1	Ki67			p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
No Amplificado	36 (24,8)	36 (24,8)	73 (50,4)	0,007
Amplificado Bajo	4 (23,5)	8 (47,1)	5 (29,4)	
Amplificado Alto	1 (5,9)	1 (5,9)	15 (88,2)	

Respecto a HER2 observamos que las valoraciones IHQ positivas (valoraciones 3) se asocian significativamente ($p<0.001$) a la presencia de la amplificación de *HER2* y de la misma forma, la ausencia de amplificaciones se correlaciona con la valoración negativa de la sobreexpresión de la proteína (Tabla 39).

La correlación de la prueba de FISH para *HER2* con los marcadores IHQ Ki67, RA, p53, p21, p16, CCND1, GATA3, AURKA, GCDFP-15 y GDF15 no mostró diferencias significativas. *HER2* se asoció de manera significativa con RE ($p=0.011$), RP ($p<0.001$), p63 ($P=0.005$), Rb ($P=0,041$), p27 ($P=0.028$), Bcl2 ($p<0.001$) y FOXA1 ($p=0.006$) (Tablas 40 y 41).

Tabla 39. Correlación entre los resultados del FISH y la IHQ para HER2

CORRELACIÓN ENTRE EL FISH PARA <i>HER2</i> Y LA EXPRESIÓN IHQ DE <i>HER2</i>				
FISH para <i>HER2</i>	HER2 IHQ			<i>p</i>
	Negativo n (%)	Borderline n (%)	Positivo n (%)	
No Amplificado	139 (91,4)	12 (7,9)	1 (0,7)	< 0,001
Amplificado	3 (11,1)	5 (18,5)	19 (70,4)	

Tabla 40. Correlación de los resultados del FISH para *HER2* con la expresión IHQ de FOXA1.

CORRELACIÓN ENTRE EL FISH PARA <i>HER2</i> Y LA EXPRESIÓN DE FOXA1					
FISH para <i>HER2</i>	FOXA1				<i>p</i>
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)	
No Amplificado	33 (21,7)	8 (5,3)	14 (9,2)	97 (63,8)	0,006
Amplificado	4 (14,8)	2 (7,4)	9 (33,3)	12 (44,5)	

Tabla 41. Correlación entre los resultados del FISH para *HER2* y la expresión IHQ de RE, RP, p63, Rb, p27 y Bcl2.

CORRELACIÓN ENTRE EL FISH PARA <i>HER2</i> CON RE, RP, p63, Rb, p27 Y Bcl2								
FISH para <i>HER2</i>	RE		<i>p</i>	RP		<i>p</i>		
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo n (%)			
No Amplif.	37 (24,3)	115 (75,7)	0,011	47 (30,9)	105 (69,1)	< 0,001		
Amplificado	13 (48,1)	14 (51,9)		19 (70,4)	8 (29,6)			
FISH para <i>HER2</i>	p63		<i>p</i>	Rb		<i>p</i>		
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo n (%)			
No Amplif.	143 (94,1)	9 (5,9)	0,005	77 (51,0)	74 (49,0)	0,041		
Amplificado	21 (77,8)	6 (22,2)		8 (29,6)	19 (70,4)			
FISH para <i>HER2</i>	p27			<i>p</i>	Bcl2			<i>p</i>
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
No Amplif.	39 (25,7)	43 (28,3)	70 (46,0)	0,028	24 (15,8)	21 (13,8)	107 (70,4)	0,028
Amplificado	10 (37,0)	12 (44,5)	5 (18,5)		17 (63,0)	4 (14,8)	6 (22,2)	

Observamos que las amplificaciones de *HER2* se asociaron a la negatividad para RP ($p < 0.001$), las expresiones bajas y negativas de Bcl2 ($p < 0.001$) y p27 ($p = 0.028$) y además con la sobreexpresión de Rb ($p = 0.041$). La ausencia de amplificaciones de

HER2 se correlacionó con la positividad para RE y RP, con altas expresiones de FOXA1, Bcl2, p27 y con la negatividad para p63 (Tablas 40 y 41).

4.4.4. Marcadores IHQ

Además del análisis por subtipos tumorales se realizó un estudio de la correlación entre los diferentes biomarcadores incluidos en el estudio.

CCND1: En la correlación de CCND1 con el resto de biomarcadores IHQ encontramos asociación significativa con: RE ($p<0.001$), RP ($p<0.001$), Rb ($p=0.001$), Bcl2 ($p<0.001$), p53 ($p=0.0035$), Ki67 ($p=0.01$), RA ($p=0.023$), p16 ($p<0.001$), p21 ($p=0.002$), p27 ($p<0.001$), FOXA1 ($p<0.001$) y GATA3 ($P=0.001$) (Tablas 42 - 44).

Los casos positivos para CCND1 (altas y bajas expresiones) mostraron asociación con la positividad para RE y RP, valoraciones positivas altas de Bcl2 y además con la ausencia de sobreexpresión de p53 (Tabla 43). Las altas expresiones de CCND1 también se asociaron a las altas expresiones de los factores de transcripción FOXA1 y GATA3, sobreexpresión de Rb y positividad alta de p27. La alta expresión de p21 (34 de 44) se correlacionó con alta expresión de CCND1 (Tablas 42 - 44). Observamos que la mayoría de los casos con CCND1 positivo alto eran a su vez tumores con altos índices de proliferación (Ki67 - tabla 43)

Tabla 42. Correlación de CCND1 con RA, p16, p21 y p27.

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CCND1 CON RA, p16, p21 y p27								
CCND1	RA n=177			P	p16 n=179			P
	Negativo n (%)	+ Bajo n (%)	+ Alto n (%)		Negativo n (%)	+ Bajo n (%)	+ Alto n (%)	
Negativo	21 (63,6)	7 (21,2)	5 (15,2)	0,023	6 (18,2)	5 (15,1)	22 (66,7)	<0,001
+ Bajo	24 (47,1)	17 (33,3)	10 (19,6)		23 (44,2)	16 (30,8)	13 (25,0)	
+ Alto	30 (32,3)	33 (35,4)	30 (32,3)		26 (27,7)	41 (43,6)	27 (28,7)	
CCND1	p21 n=179			P	p27 n=179			P
	Negativo n (%)	+ Bajo n (%)	+ Alto n (%)		Negativo n (%)	+ Bajo n (%)	+ Alto n (%)	
Negativo	22 (66,7)	7 (21,2)	4 (12,1)	0,002	19 (57,6)	8 (24,2)	6 (18,2)	<0,001
+ Bajo	34 (65,4)	12 (23,1)	6 (11,5)		24 (46,1)	16 (30,8)	12 (23,1)	
+ Alto	37 (39,4)	23 (24,4)	34 (36,2)		6 (6,3)	31 (33,0)	57 (60,6)	

La negatividad de CCND1 se asoció con los tumores negativos para RE, RP, Rb, RA, Bcl2, p21, p27 y FOXA1; así como con los altos niveles de Ki67 y con la alta

expresión de p53 y p16 (Tablas 42 - 44). Con el resto de marcadores no se encontró una asociación estadísticamente significativa.

Tabla 43. Correlación de CCND1 con RE, RP, Rb, Bcl2, p53 y Ki67

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CCND1 CON LA EXPRESIÓN DE RE, RP, Rb, Bcl2, p53 Y Ki67							
CCND1	RE n=179		p	Bcl2 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	25 (75,8)	8 (24,2)	< 0,001	17 (51,5)	7 (21,2)	9 (27,3)	< 0,001
Positivo Bajo	15 (28,8)	37 (71,2)		13 (25,0)	7 (13,5)	32 (61,5)	
Positivo Alto	10 (10,6)	84 (89,4)		11 (11,7)	11 (11,7)	72 (76,6)	
CCND1	RP n=179		p	p53 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	27 (81,8)	6 (18,2)	< 0,001	13 (39,4)	6 (18,2)	14 (42,4)	0,035
Positivo Bajo	19 (36,5)	33 (63,5)		29 (55,8)	13 (25,0)	10 (19,2)	
Positivo Alto	20 (21,3)	74 (78,7)		53 (56,4)	26 (27,7)	15 (15,9)	
CCND1	Rb n=178		p	Ki67 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	22 (66,7)	11 (33,3)	0,001	9 (27,3)	1 (3,0)	23 (69,7)	0,01
Positivo Bajo	30 (58,8)	21 (41,2)		14 (26,9)	12 (23,1)	26 (50,0)	
Positivo Alto	33 (35,1)	61 (64,9)		18 (19,1)	32 (34,1)	44 (46,8)	

Tabla 44. Correlación entre CCND1 con FOXA1 y GATA3

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CCND1 CON FOXA1 Y GATA3					
CCND1	FOXA1 n=179				p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	16 (48,5)	4 (12,1)	4 (12,1)	9 (27,3)	< 0,001
Positivo Bajo	14 (26,9)	3 (5,8)	5 (9,6)	30 (57,7)	
Positivo Alto	7 (7,4)	3 (3,2)	14 (14,9)	70 (74,5)	
CCND1	GATA3 n=179				p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	5 (15,2)	3 (9,1)	7 (21,2)	18 (54,5)	0,001
Positivo Bajo	4 (7,7)	5 (9,6)	10 (19,2)	33 (63,5)	
Positivo Alto	4 (4,3)	0 (0,0)	8 (8,5)	82 (87,2)	

Receptor de andrógenos (RA): En el análisis estadístico de RA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con los marcadores Ki67, HER2, Rb, p63, p16, p21, AURKA ni GDF15. Se observaron diferencias significativas en la

relación con RE ($p < 0.001$), RP ($p < 0.001$), Bcl2 ($p < 0.001$), CCND1 ($p = 0.023$), GCDFP-15 ($p < 0.001$), p27 ($p < 0.001$), FOXA1 ($p < 0.001$) y GATA3 ($p < 0.001$) (Tablas 45 y 46).

Tabla 45. Correlación de la expresión de RA con la expresión de RE, RP, Bcl2, CCND1, GCDFP-15 y P27.

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RA CON RE, RP, CCND1, Bcl2, CDFP-15 Y p27								
RA n=177	RE		p	Bcl2			p	
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		
	Negativo	38 (50,7)		37 (49,3)	24 (32,0)	18 (24,0)		33 (44,0)
	Positivo bajo	9 (15,8)		48 (84,2)	10 (17,5)	5 (8,8)		42 (73,7)
Positivo Alto	3 (6,7)	42 (93,3)	7 (15,6)	2 (4,4)	36 (80,0)			
RA n=177	RP		p	CCND1			p	
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		
	Negativo	42 (56,0)		33 (44,0)	21 (28,0)	24 (32,0)		30 (40,0)
	Positivo bajo	12 (21,1)		45 (78,9)	7 (12,3)	17 (29,8)		33 (57,9)
Positivo Alto	12 (26,7)	33 (73,3)	5 (11,1)	10 (22,2)	30 (66,7)			
RA n=177	GCDFP-15		p	p27			p	
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		
	Negativo	68 (90,7)		7 (9,3)	31 (41,3)	27 (36,0)		17 (22,7)
	Positivo bajo	42 (73,7)		15 (26,3)	13 (22,8)	17 (29,8)		27 (47,4)
Positivo Alto	27 (60,0)	18 (40)	5 (11,1)	11 (24,5)	29 (64,4)			

Tabla 46. Correlación entre la expresión de RA y la expresión de FOXA1 y GATA3.

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE RA CON FOXA1 Y GATA3					
RA n=177	FOXA1				p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	34 (45,3)	8 (10,7)	10 (13,3)	23 (30,7)	< 0,001
Positivo Bajo	3 (5,3)	1 (1,8)	10 (17,5)	43 (75,4)	
Positivo Alto	0 (0,0)	1 (2,2)	3 (6,7)	41 (91,1)	
RA n=177	GATA3				p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	13 (17,3)	6 (8,0)	15 (20,0)	41 (54,7)	< 0,001
Positivo Bajo	0 (0,0)	1 (1,8)	9 (15,8)	47 (82,4)	
Positivo Alto	0 (0,0)	1 (2,2)	1 (2,2)	43 (95,6)	

La negatividad para RA se asoció con las valoraciones negativas para GCDFP-15 y FOXA1. Además se observó que la mayoría de los casos negativos para RE (38 casos de 50), RP (42 casos de 66), Bcl2 (24 casos de 41), CCND1 (21 casos de 33) y p27 (31 casos de 49), así como la totalidad de los casos GATA3 negativos fueron a su vez negativos para RA (Tablas 45 y 46). La positividad para RA (baja y alta expresión)

se correlacionó con la positividad para RE, RP, alta expresión de Bcl2, CCND1, FOXA1 y GATA3. Los tumores con positividad alta para RA se correlacionaron con alta expresión de p27 (Tablas 45 y 46).

Proteína p53: La expresión de p53 se asoció significativamente con los biomarcadores RE ($p<0.001$), RP ($p=0.001$), Rb ($p=0.03$), Ki67 ($p<0.001$), p21 ($p=0.001$), Bcl2 ($p=0.008$), FOXA1 ($p<0.001$), p16 ($p=0.014$), p27 ($p=0.005$), RA ($p=0.024$), AURKA ($p<0.001$) y CCND1 ($p=0.035$). Los resultados de la correlación con CCND1 y AURKA se describen en los apartados de estos marcadores. El análisis estadístico con los marcadores HER2, p63, GATA3, GCDFP-15 y GDF15 no mostró asociaciones significativas.

Tabla 47. Correlación de la expresión de p53 con la expresión de RE, RP, Rb, Bcl2, p21, Ki67 y FOXA1.

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p53 CON RE, RP, Rb, Bcl2, p21, Ki67 Y FOXA1.							
p53	RE n=179		p	Bcl2 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	17 (17,9)	78 (82,1)	< 0,001	16 (16,8)	11 (11,6)	68 (71,6)	0,008
Positivo Bajo	9 (20,0)	36 (80,0)		9 (20,0)	6 (13,3)	30 (66,7)	
Positivo Alto	24 (61,5)	15 (38,5)		16 (41,0)	8 (20,5)	15 (38,5)	
p53	RP n=179		p	p21 n=179			P
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	28 (29,5)	67 (70,5)	0,001	56 (59,0)	18 (18,9)	21 (22,1)	0,001
Positivo Bajo	14 (31,1)	31 (68,9)		15 (33,3)	10 (22,2)	20 (44,5)	
Positivo Alto	24 (61,5)	15 (38,5)		22 (56,4)	14 (35,9)	3 (7,7)	
p53	Rb n=178		p	Ki67 n=179			P
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	54 (56,8)	41 (43,2)	0,03	29 (30,5)	26 (27,4)	40 (42,1)	< 0,001
Positivo Bajo	18 (40,0)	27 (60,0)		7 (15,6)	17 (37,8)	21 (46,7)	
Positivo Alto	13 (34,2)	25 (65,8)		5 (12,8)	2 (5,1)	32 (82,1)	
p53	FOXA1 n=179					p	
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)			
Negativo	16 (16,8)	7 (7,4)	16 (16,8)	56 (59,0)	< 0,001		
Positivo Bajo	3 (6,7)	1 (2,2)	5 (11,1)	36 (80,0)			
Positivo Alto	18 (46,2)	2 (5,1)	2 (5,1)	17 (43,6)			

Los casos positivos altos para p53 se asociaron con positividad de Rb, alta expresión de p16, alta proliferación tumoral ($Ki67>14\%$) y la negatividad para RE, RP,

RA, FOXA1, p21 y p27. Los tumores p53 negativos se correlacionaron con la positividad para RE y RP, la alta expresión de Bcl2, CCND1, p27 y FOXA1 (Tablas 47 y 48). Respecto a la relación de p53 con la expresión de p21 observamos que los casos con positividad alta para p53 y los casos negativos para p53 se distribuyeron en su mayoría en el grupo de expresión negativa de p21 (Tablas 47).

Tabla 48. Correlación de la expresión de p53 con la expresión de RA, p16 y p27.

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p53 CON RA, p16, Y p27								
P53	RA n=177			p	p16 n=179			p
	Negativo n (%)	+ Bajo n (%)	+ Alto n (%)		Negativo n (%)	+ Bajo n (%)	+ Alto n (%)	
Negativo	41 (43,2)	29 (30,5)	25 (26,3)	0,024	30 (31,6)	41 (43,1)	24 (25,3)	0,014
Positivo Bajo	11 (25,0)	18 (40,9)	15 (34,1)		12 (26,7)	15 (33,3)	18 (40,0)	
Positivo Alto	23 (60,5)	10 (26,3)	5 (13,2)		13 (33,3)	6 (15,4)	20 (51,3)	
p53		p27 n=179					p	
		Negativo n (%)	+ Bajo n (%)	+ Alto n (%)				
Negativo		23 (24,2)		31 (32,6)		41 (43,2)		0,005
Positivo Bajo		8 (17,8)		11 (24,4)		26 (57,8)		
Positivo Alto		18 (46,2)		13 (33,3)		8 (20,5)		

Los casos que se clasificaron como positivos bajos para p53 se asociaron con las altas expresiones de p27, FOXA1, Bcl2 y Ki67, al igual que con la positividad para RE y RP, comportándose de manera similar a los casos p53 negativos (Tablas 47 y 48).

AURKA: Se observó que la expresión IHQ de AURKA fue positiva en 32 casos con tan sólo 5 de ellos con expresión alta de AURKA, lo que limitó el análisis estadístico para este grupo de tumores. Sin embargo encontramos correlación significativa con RE ($p<0.001$), RP ($p=0.008$), p53 ($p<0.001$), p21 ($p=0.001$), Rb ($p=0.042$) y Ki67 ($p<0.001$) (Tabla 49). Los resultados en relación con la expresión de HER2, FOXA1, GATA3, CCND1, RA, p63, p16, p27, GCDP-15 y GDF15 no mostraron diferencias significativas.

Encontramos una asociación entre la ausencia de expresión de AURKA se y la positividad de RE y RP, así como con la negatividad para p53 y p21. Respecto a su relación con el índice de proliferación celular, observamos que a medida que aumenta el Ki67 aumenta la expresión de AURKA. La positividad de AURKA se asoció significativamente con los casos con sobreexpresión de Rb (Tabla 49).

Tabla 49. Correlación de la expresión de AURKA con la expresión de RE, RP, Rb, p53, p21, Ki67 y Bcl2.

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE AURKA CON RE, RP, Rb, p53, p21, Ki67 Y Bcl2.							
AURKA	RE n=179		p	p53 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	33 (22,4)	114 (77,6)	<0,001	89 (60,6)	35 (23,8)	23 (15,6)	< 0,001
Positivo Bajo	16 (59,3)	11 (40,7)		5 (18,5)	8 (29,6)	14 (51,9)	
Positivo Alto	1 (20,0)	4 (80,0)		1 (20,0)	2 (40,0)	2 (40,0)	
AURKA	RP n=179		p	p21 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	48 (32,7)	99 (67,3)	0,008	80 (54,4)	29 (19,7)	38 (25,9)	0,001
Positivo Bajo	17 (63,0)	10 (37,0)		13 (48,2)	8 (29,6)	6 (22,2)	
Positivo Alto	1 (20,0)	4 (80,0)		0 (0,0)	5 (100,0)	0 (0,0)	
AURKA	Rb n=178		p	Ki67 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	76 (52,1)	70 (47,9)	0,042	40 (27,2)	42 (28,6)	65 (44,2)	< 0,001
Positivo Bajo	7 (25,9)	20 (74,1)		0 (0,0)	0 (0,0)	27 (100,0)	
Positivo Alto	2 (40,0)	3 (60,0)		1 (20,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	
AURKA	Bcl2 n=179			p			p
	Negativo n (%)		Positivo Bajo n (%)		Positivo Alto n (%)		
Negativo	31 (21,1)		19 (12,9)	97 (66,0)		0,055	
Positivo Bajo	10 (37,0)		6 (22,2)	11 (40,8)			
Positivo Alto	0 (0,0)		0 (0,0)	5 (100,0)			

Proteína p16: La asociación de p16 con RE ($p<0.001$), RP ($P=0.003$), FOXA1 ($p=0.009$), GATA3 ($p=0.043$), Rb ($p=0.02$), Ki67 ($p=0.004$) y p27 (0.023) fue estadísticamente significativa (Tablas 50 y 51).

Las expresiones negativas y positivas bajas de p16 se correlacionaron con la positividad para RE y RP. Las expresiones positivas bajas de p16 se asociaron a alta positividad de FOXA1, GATA3, p27 y sobreexpresión de Rb. Finalmente, encontramos que los tumores con positividad alta para p16 se relacionaron con la negatividad para Rb y los altos índices de proliferación tumoral (Ki67) (Tabla 50 y 51).

Proteína p21: En el análisis estadístico de la expresión de p21 en relación a los demás marcadores no se identificaron diferencias significativas con RE, RP, RA, Bcl2, p16, GCDP-15 y GDF15. Se encontró una asociación de p21 con p63 ($p=0.002$), Rb ($p<0.001$), HER2 ($p=0.015$), Ki67 ($p=0.005$), FOXA1 ($p=0.01$) y GATA3 ($p=0.02$)

(Tablas 52 y 53). Observamos una tendencia de asociación ($p=0.052$) entre los casos con expresión alta de p21 y los tumores con alta positividad para p27 (Tabla 52).

Tabla 50. Correlación entre la expresión de p16 con la expresión de RE, RP, FOXA1 Y GATA3

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE p16 CON RE, RP, FOXA1 Y GATA3						
p16 n=179	RE		p	RP		p
	Neg. n (%)	Post. n (%)		Neg. n (%)	Post. n (%)	
Negativo	14 (25,5)	41 (74,5)	<0,001	18 (32,7)	37 (67,3)	0,003
Positivo Bajo	8 (12,9)	54 (87,1)		15 (24,2)	47 (75,8)	
Positivo Alto	28 (45,2)	34 (54,8)		33 (53,2)	29 (46,8)	
p16 n=179	FOXA1				p	
	Negativo n (%)	+ Bajo n (%)	+ Medio n (%)	+ Alto n (%)		
Negativo	14 (25,5)	1 (1,8)	8 (14,5)	32 (58,2)	0,009	
Positivo Bajo	4 (6,5)	3 (4,8)	8 (12,9)	47 (75,8)		
Positivo Alto	19 (30,6)	6 (9,7)	7 (11,3)	30 (48,4)		
p16 n=179	GATA3				p	
	Negativo n (%)	+ Bajo n (%)	+ Medio n(%)	+ Alto n (%)		
Negativo	6 (10,9)	4 (7,3)	8 (14,5)	37 (67,3)	0,043	
Positivo Bajo	1 (1,6)	2 (3,2)	4 (6,5)	55 (88,7)		
Positivo Alto	6 (9,7)	2 (3,2)	13 (21,0)	41 (66,1)		

Tabla 51. Correlación entre la expresión de p16 con la expresión de Rb, Ki67 y p27

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE p16 CON Rb, Ki67 Y p27								
p16	Rb n=178		p	Ki67 n=179			p	
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		
	Negativo	28 (51,9)		26 (48,1)	21 (38,2)	11 (20,0)		23(41,8)
	Positivo Bajo	21 (33,9)		41 (66,1)	10 (16,1)	22 (35,5)		30 (48,4)
Positivo Alto	36 (58,1)	26 (41,9)	10 (16,1)	12 (19,4)	40 (64,5)	0,004		
p16	p27 n=179					p		
	Negativo n (%)		Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)				
Negativo	20 (36,4)		13 (23,6)	22 (40,0)		0,023		
Positivo Bajo	10 (16,1)		18 (29,0)	34 (54,9)				
Positivo Alto	19 (30,6)		24 (38,8)	19 (30,6)				

Los casos con valoraciones negativas de p21 se asociaban a los tumores HER2 y Rb negativos. La mayor parte de los casos con negatividad para Ki67 (32 casos de 41), p27 (32 casos de 49), FOXA1 (25 casos de 37) y GATA3 (10 casos de 13) eran a su vez p21 negativos (Tablas 52 y 53).

La positividad para p21 (baja y alta expresión) se correlacionó con la sobreexpresión de Rb y con altos niveles de Ki67. La mayor parte de los casos con expresión alta de p21 y altos índices de Ki67 (20 de 27 casos, un 74.1%), eran a su vez tumores RE positivos. Dentro de los casos HER2 positivos cerca del 50% presentan alta positividad para p21.

Tabla 52. Correlación de la expresión de p21 con la expresión de Rb, HER2, p63, Ki67 y p27

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p21 CON p63, Rb, HER2, Ki67 Y p27							
p21	p63 n=179		p	HER2 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Borderline n (%)	Positivo n (%)	
Negativo	89 (95,7)	4 (4,3)	0,002	82 (88,2)	4 (4,3)	7 (7,5)	0,015
Positivo Bajo	33 (78,6)	9 (21,4)		31 (73,8)	7 (16,7)	4 (9,5)	
Positivo Alto	42 (95,5)	2 (4,5)		29 (65,9)	6 (13,6)	9 (20,5)	
p21	Rb n=178		p	Ki67 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	57 (62,0)	35 (38,0)	< 0,001	32 (34,4)	19 (20,4)	42 (45,2)	0,005
Positivo Bajo	16 (38,1)	26 (61,9)		5 (11,9)	13 (31,0)	24 (57,1)	
Positivo Alto	12 (27,3)	32 (72,7)		4 (9,1)	13 (29,5)	27 (61,4)	
p21	p27 n=179			p			
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)				
Negativo	32 (34,4)	28 (30,1)	33 (35,5)	0,052			
Positivo Bajo	10 (23,8)	16 (38,1)	16 (38,1)				
Positivo Alto	7 (15,9)	11 (25,0)	26 (59,1)				

Tabla 53. Correlación de la expresión de p21 con la expresión de FOXA1 y GATA3

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE p21 CON FOXA1 Y GATA3					
p21	FOXA1 n=179				p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	25 (26,9)	7 (7,5)	15 (16,1)	46 (49,5)	0,01
Positivo Bajo	9 (21,4)	3 (7,1)	2 (4,8)	28 (66,7)	
Positivo Alto	3 (6,8)	0 (0,0)	6 (13,6)	35 (79,6)	
p21	GATA3 n=179				p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	10 (10,8)	6 (6,5)	18 (19,3)	59 (63,4)	0,02
Positivo Bajo	3 (7,1)	1 (2,4)	5 (11,9)	33 (78,6)	
Positivo Alto	0 (0,0)	1 (2,3)	2 (4,5)	41 (93,2)	

Respecto a los factores de transcripción FOXA1 y GATA3, se evidenció que las altas expresiones de p21 se correlacionaban con las altas expresiones (>79%) de ambos marcadores. En la valoración de la relación de p21 con la expresión de p63 observamos que más del 50% (9 casos de 15) de los tumores p63 positivo eran p21 positivo bajo (Tabla 53).

Proteína p27: La relación de p27 con los receptores hormonales RE y RP mostró asociación significativa ($p < 0.001$) de las altas expresiones de p27 con los casos RE+ y RP+, así como las valoraciones negativas para p27 se asociaron a la negatividad para los receptores hormonales (Tabla 54).

Tabla 54. Correlación entre la expresión de p27 y la expresión de RE y RP

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p27 CON RE Y RP						
p27 n=179	RE		p	RP		p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Negativo	30 (61,2)	19 (38,8)	< 0,001	32 (65,3)	17 (34,7)	< 0,001
Positivo Bajo	17 (30,9)	38 (69,1)		23 (41,8)	32 (58,2)	
Positivo Alto	3 (4,0)	72 (96,0)		11 (14,7)	64 (85,3)	

La correlación de p27 con Bcl2 ($p < 0.001$), FOXA1 ($p < 0.001$), GATA3 ($p < 0.001$) y Rb ($p = 0.010$) fue estadísticamente significativa, mostrando asociación de las altas expresiones de p27 con las altas expresiones Bcl2, FOXA1 y GATA3 y con la sobreexpresión de Rb (Tabla 55). La negatividad de p27 se asoció con la negatividad para FOXA1 y Bcl2. Se observó que la mayoría de los tumores GATA3 negativos eran p27 negativos. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas en la correlación del p27 con Ki67, HER2, p63, GCDPF-15 ni GDF15.

Proteína p63: La expresión en células tumorales del marcador de estirpe basal y/o mioepitelial p63 en nuestra serie fue predominantemente negativa con tan sólo 8.4% de tumores de la serie (15 casos de 179) positivos para p63. La expresión de p63 en células tumorales se asoció significativamente ($p = 0.002$) con la negatividad para RP. Con respecto al RE, se identificó asociación entre la negatividad para p63 y los tumores RE+ ($p = 0.022$). La asociación con FOXA1 también fue estadísticamente significativa ($p = 0.001$), mostrando relación entre los tumores p63 negativos y las altas expresiones de FOXA1 (Tabla 56).

Tabla 55. Correlación entre la expresión de p27 y la expresión de Rb, Bcl2, FOXA1 y GATA3

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p27 CON Rb, Bcl2, FOXA1 Y GATA3							
p27	Rb n=178		P	Bcl2 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	26 (54,2)	22 (45,8)	0,01	23 (46,9)	9 (18,4)	17 (34,7)	< 0,001
Positivo Bajo	33 (60,0)	22 (40,0)		9 (16,4)	10 (18,2)	36 (65,4)	
Positivo Alto	26 (34,7)	49 (65,3)		9 (12,0)	6 (8,0)	60 (80,0)	
p27	FOXA1 n=179					p	
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)			
Negativo	24 (49,0)	2 (4,1)	6 (12,2)	17 (34,7)	< 0,001		
Positivo Bajo	10 (18,2)	6 (10,9)	12 (21,8)	27 (49,1)			
Positivo Alto	3 (4,0)	2 (2,6)	5 (6,7)	65 (86,7)			
p27	GATA3 n=179				p		
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)			
Negativo	11 (22,5)	8 (16,3)	10 (20,4)	20 (40,8)	< 0,001		
Positivo Bajo	2 (3,6)	0 (0,0)	10 (18,2)	43 (78,2)			
Positivo Alto	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (6,7)	70 (93,3)			

Tabla 56. Correlación entre la expresión de p63 y la expresión de RE, RP y FOXA1.

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE p63 CON RE, RP Y FOXA1						
p63 n=179	RE		p	RP		p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Negativo	42 (25,6)	122 (74,4)	0,022	55 (33,5)	109 (66,5)	0,002
Positivo	8 (53,3)	7 (46,7)		11 (73,3)	4 (26,7)	
p63 n=179	FOXA1				p	
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)		
Negativo	33 (20,1)	8 (4,9)	17 (10,4)	106 (64,6)	0,001	
Positivo	4 (26,7)	2 (13,3)	6 (40,0)	3 (20,0)		

El análisis estadístico mostró una asociación entre la positividad de p63 y las valoraciones negativas de HER2 ($p=0.017$) así como con las expresiones bajas de p21 ($p=0.002$). Adicionalmente encontramos una tendencia estadística ($p=0.074$) en la correlación de los casos p63 positivos con el alto nivel de Ki67 ($>14\%$), no existiendo ningún caso p63 negativo con índices de Ki67 $<3\%$ o negativos (Tabla 57). El estudio estadístico no mostró diferencias significativas en la relación de p63 con CCND1, RA, AURKA, Rb, GATA3, Bcl2, p53, p16, p27, GCDP-15 ni GDF15.

Tabla 57. Correlación entre la expresión de p63 y la expresión de HER2, Ki67 y p21.

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p63 CON HER2, Ki67 y p21								
p63 n=179	HER2			p	Ki67			p
	Negativo n (%)	Bordeline n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	+ Bajo n (%)	+ Alto n (%)	
Negativo	133 (81,1)	16 (9,8)	15 (9,1)	0,017	41 (25,0)	41 (25,0)	82 (50,0)	0,074
Positivo	9 (60,0)	1 (6,7)	5 (33,3)		0 (0,0)	4 (26,7)	11 (73,3)	
p63 n=179		p21						p
		Negativo n (%)		+ Bajo n (%)		+ Alto n (%)		
Negativo		89 (54,3)		33 (20,1)		42 (25,6)		0,002
Positivo		4 (26,7)		9 (60,0)		2 (13,3)		

GCDFP-15: El análisis estadístico de la asociación de GCDFP-15 con el resto de los marcadores IHQ únicamente mostró correlación significativa con RA ($p < 0.001$) y GDF15 ($p < 0.001$) donde la negatividad para GCDFP-15 se asoció a la negatividad de GDF15 y la negatividad de RA (Tabla 58).

Tabla 58. Correlación entre la expresión de GCDFP-15 y la expresión de GDF15 y RA

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE GCDFP-15 Y LA EXPRESIÓN DE GDF15 Y RA							
GCDFP-15	GDF15 n=179		p	RA n=177			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	114 (82,0)	25 (18,0)	< 0,001	68 (49,6)	42 (30,7)	27 (19,7)	< 0,001
Positivo	21 (52,5)	19 (47,5)		7 (17,5)	15 (37,5)	18 (45,0)	

GDF15: La correlación de GDF15 con los marcadores IHQ, no mostró diferencias significativas a excepción de la ya descrita con GCDFP-15 y la asociación con HER2 ($p = 0.032$). Los tumores GDF15 negativos se asociaron a las valoraciones negativas de HER2 (Tabla 59).

Tabla 59. Correlación entre la expresión de GDF15 y HER2

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE GDF15 Y HER2				
GDF15 n=179	HER2 IHQ			p
	Negativo n (%)	Borderline n (%)	Positivo n (%)	
NEGATIVO	113 (83,8)	11 (8,1)	11 (8,1)	0,032
POSITIVO	29 (65,9)	6 (13,6)	9 (20,5)	

Proteína Rb: El análisis de la correlación entre Rb y los marcadores RE, RP, RA, Bcl2, p63, GCDFP-15 y GDF15 no mostró diferencias significativas, y los resultados obtenidos de la asociación de Rb con CCND1, p53, p16, p21, p27 y AURKA

ya han sido descritos en los apartados de estos marcadores. Encontramos correlación de Rb con Ki67 ($p<0.001$), FOXA1 ($p=0.019$), GATA3 ($p<0.001$) y HER2 ($p=0.002$).

Tabla 60. Correlación de la expresión de Rb con la expresión de Ki67, HER2, FOXA1 y GATA3

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Rb CON Ki67, HER2, FOXA1 Y GATA3					
Rb n=178	Ki67			p	
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		
Negativo	29 (34,1)	23 (27,1)	33 (38,8)	< 0,001	
Positivo	11 (11,8)	22 (23,7)	60 (64,5)		
Rb n=178	HER2			p	
	Negativo n (%)	Borderline n (%)	Positivo n (%)		
Negativo	77 (90,6)	4 (4,7)	4 (4,7)	0,002	
Positivo	64 (68,8)	13 (14,0)	16 (17,2)		
Rb n=178	FOXA1				p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	23 (27,1)	7 (8,2)	13 (15,3)	42 (49,4)	0,019
Positivo	14 (15,1)	3 (3,2)	9 (9,7)	67 (72,0)	
Rb n=178	GATA3				p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	11 (12,9)	7 (8,2)	15 (17,7)	52 (61,2)	< 0,001
Positivo	2 (2,2)	1 (1,1)	9 (9,7)	81 (87,0)	

Se observó asociación de la sobreexpresión de Rb con los altos niveles de proliferación (Ki67), alta expresión de FOXA1 y GATA3, así como asociación entre la negatividad para Rb y la negatividad del HER2 (Tabla 60).

Bcl2: En el análisis estadístico de la correlación de la expresión de Bcl2 con los biomarcadores del estudio se encontraron diferencias significativas en la asociación con RE ($p<0.001$), RP ($p<0.001$), Ki67 ($P=0.004$), p27 ($p<0.001$), HER2 ($p<0.001$), FOXA1 (<0.001) y GATA3 ($p<0.001$). La relación de Bcl2 con RA ($p<0.001$), CCND1 ($p<0.001$), AURKA ($p=0.055$) y p53 ($p=0.008$) mostró asociaciones significativas que han sido descritas previamente en los apartados de estos marcadores. Con el resto de marcadores no se encontraron diferencias significativas.

Las altas expresiones de Bcl2 se asociaron con los tumores RE+, RP+, con alta expresión para p27, FOXA1 y GATA3 y además con la negatividad para HER2. Adicionalmente observamos que cerca de la mitad de los tumores (48 casos de 93) con

altos niveles de Ki67 tenían alta expresión positiva para Bcl2 (Tabla 60). Los casos Bcl2 negativos se asociaron a la negatividad de RE, RP y p27. La mayoría de las valoraciones positivas de HER2 (valoración 3) eran a su vez tumores Bcl2 negativos. (Tabla 61).

Tabla 61. Correlación entre la expresión de Bcl2 y la expresión de RE, RP, Ki67, HER2, p27, FOXA1 y GATA3

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Bcl2 CON RE, RP, Ki67, p27, HER2, GATA3 Y FOXA1.								
Bcl2 n=179	RE		p	Ki67			p	
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		
Negativo	27 (65,9)	14 (34,1)	< 0,001	10 (24,4)	3 (7,3)	28 (68,3)	0,004	
Positivo Bajo	16 (64,0)	9 (36,0)		4 (16,0)	4 (16,0)	17 (68,0)		
Positivo Alto	7 (6,2)	106 (93,8)		27 (23,9)	38 (33,6)	48 (42,5)		
Bcl2 n=179	RP		p	p27			p	
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)		
Negativo	33 (80,5)	8 (19,5)	< 0,001	23 (56,0)	9 (22,0)	9 (22,0)	< 0,001	
Positivo Bajo	18 (72,0)	7 (28,0)		9 (36,0)	10 (40,0)	6 (24,0)		
Positivo Alto	15 (13,3)	98 (86,7)		17 (15,0)	36 (31,9)	60 (53,1)		
Bcl2 N=179	HER2						p	
	Negativo n (%)		Borderline n (%)	Positivo n (%)				
Negativo	23 (56,1)		4 (9,8)	14 (34,1)			< 0,001	
Positivo Bajo	21 (84,0)		2 (8,0)	2 (8,0)				
Positivo Alto	98 (86,7)		11 (9,7)	4 (3,6)				
Bcl2 n=179	FOXA1							p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)		Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)			
Negativo	14 (34,1)	3 (7,3)		5 (12,2)	19 (46,4)			< 0,001
Positivo Bajo	12 (48,0)	3 (12,0)		4 (16,0)	6 (24,0)			
Positivo Alto	11 (9,8)	4 (3,5)		14 (12,4)	84 (74,3)			
Bcl2 n=179	GATA3							p
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)		Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)			
Negativo	5 (12,2)	5 (12,2)		10 (24,4)	21 (51,2)			0,001
Positivo Bajo	3 (12,0)	0 (0,0)		6 (24,0)	16 (64,0)			
Positivo Alto	5 (4,4)	3 (2,6)		9 (8,0)	96 (85,0)			

GATA3: La correlación de la expresión de GATA3 con los otros marcadores IHQ, mostró que no existían asociaciones con Ki67, HER2, p53, p63, GCDP-15, AURKA ni con GDF15. Además de las asociaciones ya descritas en los apartados anteriores, encontramos correlación de las expresiones de GATA3 con RE ($p < 0.001$), RP ($p < 0.001$), Rb ($p < 0.001$), p27 ($p < 0.001$) y FOXA1 ($p < 0.001$).

Tabla 62. Correlación de la expresión de GATA3 con la expresión de RE, RP, Rb, p27 y FOXA1

CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GATA3 CON RE, RP, Rb, p27 Y FOXA1.							
GATA3	RE n=179		p	RP n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)		Positivo n (%)	
Negativo	10 (76,9)	3 (23,1)	< 0,001	10 (76,9)	3 (23,1)		< 0,001
Positivo Bajo	5 (62,5)	3 (37,5)		5 (62,5)	3 (37,5)		
Positivo Medio	15 (60,0)	10 (40,0)		16 (64,0)	9 (36,0)		
Positivo Alto	20 (15,0)	113 (85,0)		35 (26,3)	98 (73,7)		
GATA3	Rb n=178		p	p27 n=179			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Alto n (%)	
Negativo	11 (84,6)	2 (15,4)	< 0,001	11 (84,6)	2 (15,4)	0 (0,0)	< 0,001
Positivo Bajo	7 (87,5)	1 (12,5)		8 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Positivo Medio	15 (62,5)	9 (37,5)		10 (40,0)	10 (40,0)	5 (20,0)	
Positivo Alto	52 (39,1)	81 (60,9)		20 (15,0)	43 (32,3)	70 (52,7)	
GATA3	FOXA1 n=179					p	
	Negativo n (%)	Positivo Bajo n (%)	Positivo Medio n (%)	Positivo Alto n (%)			
Negativo	12 (92,3)	0 (0,0)	1 (7,7)	0 (0,0)	< 0,001		
Positivo Bajo	5 (62,5)	1 (12,5)	0 (0,0)	2 (25,0)			
Positivo Medio	9 (36,0)	6 (24,0)	6 (24,0)	4 (16,0)			
Positivo Alto	11 (8,3)	3 (2,3)	16 (12,0)	103 (77,4)			

Los tumores GATA3 negativos se asociaban a la negatividad para RE, RP, Rb, p27 y FOXA1. Las expresiones bajas de GATA3 se correlacionaron con la negatividad para Rb y p27. Las valoraciones positivas altas de GATA3 se correlacionaron con los tumores RE, RP y Rb positivos y con alta expresión de p27 y FOXA1 (Tabla 62).

FOXA1: La correlación de FOXA1 con los otros biomarcadores del estudio mostró asociación significativa con RE ($p < 0.001$), RP ($p < 0.001$), Rb ($p = 0.019$) y HER2 ($p = 0.003$), además de la descritas en los apartados del resto de los marcadores. Los tumores con valoraciones negativas y positivas bajas para FOXA1 se asociaban a la negatividad de RE, RP, Rb y HER2. Los casos positivos altos mostraron asociación con las valoraciones positivas de RE, RP y Rb. Adicionalmente observamos que un 50% (10 casos de 20) de los casos HER2 positivos tenían alta expresión de FOXA1. La mayoría de los casos *Borderline* (82%) fueron FOXA1 positivos altos (Tabla 63). No se encontraron diferencias significativas en la asociación con Ki67, GCDP-15, AURKA ni GDF15.

Tabla 63. Correlación entre la expresión de FOXA1 y la expresión de RE, RP, Rb y HER2

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE FOXA1 CON RE, RP, Rb Y HER2							
FOXA1	RE n=179		<i>p</i>	RP n=179		<i>p</i>	
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Positivo n (%)		
Negativo	29 (78,4)	8 (21,6)	< 0,001	31 (83,8)	6 (16,2)	< 0,001	
Positivo Bajo	6 (60,0)	4 (40,0)		7 (70,0)	3 (30,0)		
Positivo Medio	7 (30,4)	16 (69,6)		9 (39,1)	14 (60,9)		
Positivo Alto	8 (7,3)	101 (92,7)		19 (17,4)	90 (82,6)		
FOXA1	Rb n=178		<i>p</i>	HER2 n=179			<i>p</i>
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		Negativo n (%)	Borderline n (%)	Positivo n (%)	
Negativo	23 (62,2)	14 (37,8)	0,019	35 (94,6)	1 (2,7)	1 (2,7)	0,003
Positivo Bajo	7 (70,0)	3 (30,0)		8 (80,0)	1 (10,0)	1 (10,0)	
Positivo Medio	13 (59,1)	9 (40,9)		14 (60,9)	1 (4,3)	8 (34,8)	
Positivo Alto	42 (38,5)	67 (61,5)		85 (78,0)	14 (12,8)	10 (9,2)	

4.4.5. Supervivencia Global (SG) y Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE)

La SG de la serie a los 96 meses (8 años) fue del 62,9%, (IC 95%: 49,38 – 76,42) (Figura 29). De los 179 casos incluidos en el estudio, 36 casos fallecieron y se registraron 49 recaídas hallando un porcentaje de SLE de un 57%, a los 96 meses (IC 95%: 43,09 – 70,91). La media de seguimiento de la serie fue de 44,9 meses con un rango entre 1 y 179 meses.

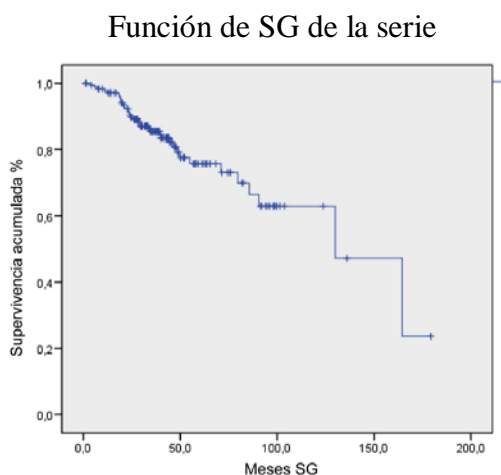


Figura 29. Supervivencia Global (SG) de la serie

Se realizó el análisis de SG y la SLE en relación a los marcadores clínico-patológicos, los subtipos tumorales y los marcadores IHQ, mostrando asociación significativa de la SG con el grupo de edad ($p=0,011$), tamaño tumoral ($p=0,001$), grado histológico ($p=0,014$), afectación ganglionar ($p=0,001$), subtipo tumoral ($p=0,002$), RE ($p=0,001$), RP ($p=0,045$), Bcl2 ($p=0,041$), p16 ($p=0,019$) y GDF15 ($p=0,017$). La SLE se asoció significativamente con los grupos de edad ($p=0,008$), tamaño tumoral ($p=0,045$), grado histológico ($p=0,011$), afectación ganglionar ($p=0,004$), subtipo tumoral ($p<0,001$), RE ($p<0,001$), RP ($p=0,001$), Bcl2 ($p=0,040$), GATA3 ($p=0,025$), FISH para *CCND1* ($p=0,038$) y FISH para *HER2* ($p=0,011$).

Para el análisis de las curvas de SG y SLE de los parámetros clínicos se utilizó como punto de corte los 60 meses de seguimiento. Encontramos que según el grupo de edad, los casos con mejor tasa de supervivencia fueron las pacientes de 40-65 años con un 80.1% de SG (IC 95%: 74.5 - 91.07), seguido del grupo de pacientes menores de 40 años con 77.6% de SG (IC 95%: 57.8 - 97.39) y finalmente el grupo con peor SG fue el de mayores de 65 años con 68.5% de SG (IC 95%: 54.59 - 82.41). Sin embargo, en la SLE las curvas mostraron un comportamiento muy diferente. El grupo con SLE más prolongada fue el de las pacientes mayores de 65 años con un 84.5% (IC 95%: 73.92 - 95.08) y el grupo de menores de 40 años tuvo el mayor número de recaídas en los primeros 60 meses de seguimiento con un porcentaje de SLE del 46.8% (IC 95%: 21.13 - 72.47) (Figura 30).

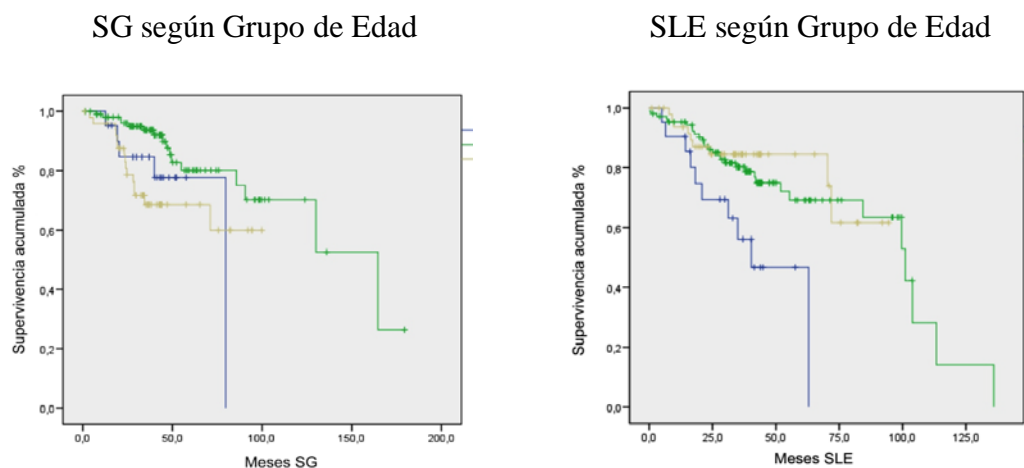


Figura 30. Curvas de SG (izquierda) y SLE (derecha) según el grupo de edad. Línea Azul: Menores de 40 años; Línea Verde: Entre 41 y 65 años; Línea Amarilla: Mayores de 65 años.

Respecto al grado histológico observamos un comportamiento particular de las curvas de SG y SLE. Utilizando el punto de corte de 60 meses, encontramos que según aumentaba el grado disminuía la tasa de SG y SLE como era lo esperado, con porcentajes de SG de 96.3% (IC 95%: 89.25 – 103.3) para los carcinomas grado I, 83.2% (IC 95%: 69.68 – 96.72) para los casos de grado intermedio y 64.2% (IC 95% 51.27 – 77.13) para el grupo de tumores grado III. Sin embargo, en el seguimiento a 96 meses se observó que la curva de SG de los tumores grado II se entrecruzaba con la de los casos grado III terminando con la peor tasa de SG a 96 meses (52,7% con IC 95%: 26.83 – 78.57 vs 64.2% con IC 95%: 51.27 – 77.13 respectivamente).

En cuanto a la SLE observamos que el grupo de tumores mejor diferenciados obtuvieron la mayor tasa de SLE a 60 meses de 96.8% (IC 95%: 91.64 – 101.96), seguido de los casos grado II con una tasa de SLE de 73.9% (IC 95%: 59.6 – 88.21) y finalmente la menor tasa de SLE la obtuvieron los tumores grado III (58.2% con IC 95%: 44.68 – 71.72). Similar al comportamiento de la curva de SG, en la SLE observamos que a seguimientos igual o mayores de 96 meses las curvas de los grados bajos e intermedios se aproximan hasta llegar a cruzarse, obteniendo un porcentaje de SLE a 96 meses de 51.6% (IC 95%: 4.3 – 98.83) para los grados I y 67.7% (IC 95%: 58.8 – 76.6) para los grados II.

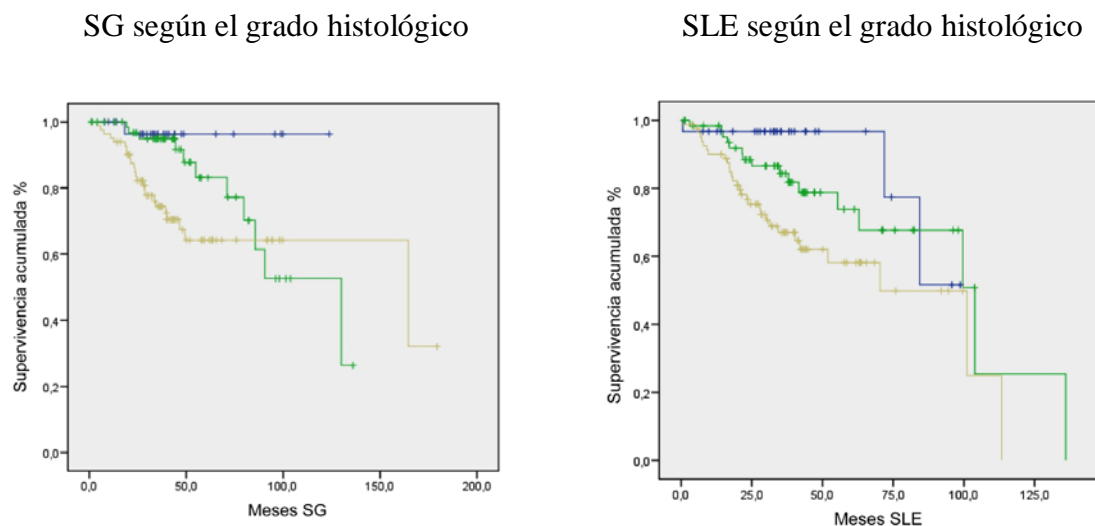


Figura 31. Curvas de SG (izquierda) y SLE (derecha) según el grado histológico. Línea Azul: Grado I; Línea Verde: Grado II; Línea Amarilla: Grado III.

Otro de los factores clínico-patológicos que mostró asociación con la SG y SLE fue el tamaño tumoral. Encontramos que los tamaños tumorales T1 obtuvieron la mejor tasa de SG a 60 meses (85.9% con IC 95%: 70.22 – 101.58) con gran diferencia en comparación con los tumores T2 que tuvieron un porcentaje de SG de 67.1% (IC 95%: 53.97 – 80.23) y los casos T3 que obtuvieron la peor tasa de SG (42.3% con OC 95%: 3.29 – 81.3). En el estudio de la SLE a 60 meses observamos que los tumores T1 tuvieron la mayor tasa de SLE (87.7% con IC 95%: 78.8 - 96.52) comparado con los otros dos grupos T2 y T3, los cuales tuvieron curvas similares con una SLE a 60 meses de 57.6% (IC 95%: 43.69 - 65.51) para los casos T2 y 52.8% (IC 95%: 27.27 - 92.73) para los tumores T3 (Figura 32).

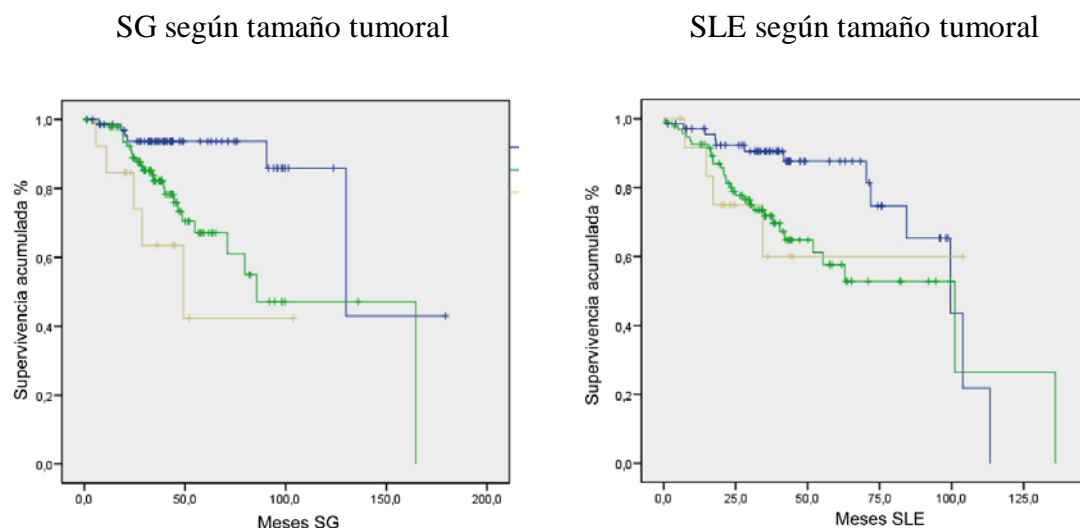
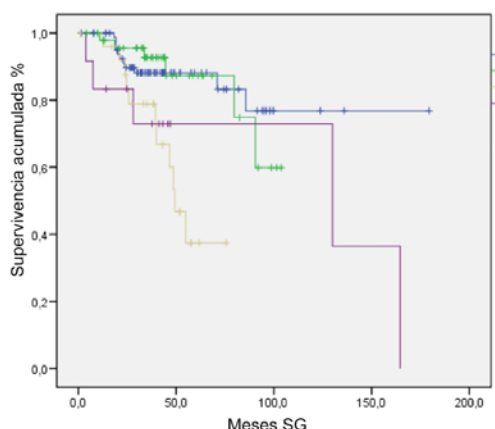


Figura 32. Curvas de SG (izquierda) y SLE (derecha) según el tamaño tumoral. Línea Azul: T1 – Tumor ≤ 2 cm; Línea Verde: T2 Tumor de 2 a 5cm; Línea Amarilla: T3 – Tumor > 5 cm.

En el estudio de supervivencia según la afectación ganglionar, observamos que las curvas de los grupos N0 y N1, tenían un comportamiento similar con porcentajes de SG y SLE a 60 meses de 88.2% (IC 95%: 80.95 - 95.45) de SG y 78.6% (IC 95%: 66.45 - 90.75) de SLE en el grupo N0 y 87.3% (IC 95%: 74.56 - 100.04) de SG y 75.1% (IC 95%: 57.66 - 92.54) de SLE para los casos N1. Los tumores de los grupos N2 y N3 tuvieron peores tasas de SG y SLE con porcentajes de SG a 60 meses de 37.4% (IC 95%: 12.11 - 62.68) en las afectaciones ganglionares N2 y 72.9 % (IC 95%: 46.44 - 99.36) en las altas afectaciones ganglionares. Así mismo, la menor tasa de SLE fue la de los casos N2 con un 40.8% (17.28 - 64.32) mientras que el porcentaje de los tumores N3 fue de 60.6% con IC 95% (30.42 - 90.78) (Figura 33).

SG según afectación ganglionar



SLE según afectación ganglionar

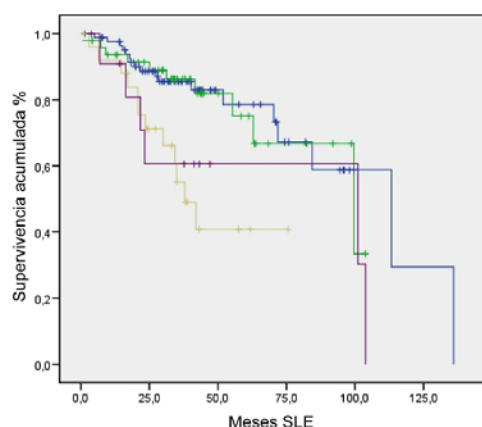


Figura 33. Curvas de SG (izquierda) y SLE (derecha) según la afectación ganglionar. Línea Azul: N0 – No afectación Ganglionar; Línea Verde: N1 – Afectación de 1 a 3 ganglios; Línea Amarilla: N2 – Afectación de 4 a 9 ganglios; Línea Violeta: N3 – Afectación de más de 9 ganglios.

En el análisis de la SG y SLE según el tipo tumoral de nuestros casos se utilizó 96 meses como punto de corte. Encontramos una SG y SLE más prolongada en el subtipo tumoral Luminal A, que presentó un 76.1% (IC 95%: 56.9 - 95.3) de SG y 62.3% (IC 95%: 42.12 - 82.48) de SLE. La menor tasa de SG la encontramos en los subtipos Luminal B y HER2 Sobreexpresado, con una SG de 59.3% (IC 95%: 34.02 - 84.58) y 31.7% (IC 95%: 0 - 77.95) respectivamente. La curva de SLE tuvo un comportamiento similar a la de la SG, con porcentajes de 49.7% (8.94 - 90.46) para el subtipo Luminal B y 34.2% (IC 95%: 7.16 - 61.24) en los casos HER2 Sobreexpresado. Los tumores Triple Negativos tuvieron un comportamiento intermedio con una tasa de SG de 64% (IC 95%: 46.17 - 87.83) y SLE 59.3% (IC 95%: 41.66 - 76.94) (Figura 34).

Para el análisis de SG según los marcadores RE, RP y Bcl2 se utilizó 60 meses como punto de corte. Encontramos que los tumores RE+, RP+ y Bcl2 positivos altos tenían la mejor tasa de SG con 80.2% (IC 95%: 70.21 - 90.19) para los casos RE+, 78.6% (IC 95%: 67.43 - 89.77) para los RP+ y 80.9% (IC 95%: 70.12 - 91.68) para los tumores con expresión alta de Bcl2, mientras que los grupos de tumores RE-, RP- y las bajas expresiones de Bcl2 tuvieron peor SG. El porcentaje de SG a 60 meses fue de 65,1% (IC 95%: 50.2 - 79.9) en los tumores RE-, 61.6% (IC 95%: 40.23 - 72.5) para los casos RP-, 63.4% (IC 95%: 42.82 - 83.78) en los casos con baja expresión de Bcl2 y 68.7% (IC 95%: 49.12 - 88.28) en los tumores negativos para Bcl2 (Figuras 35 -37).

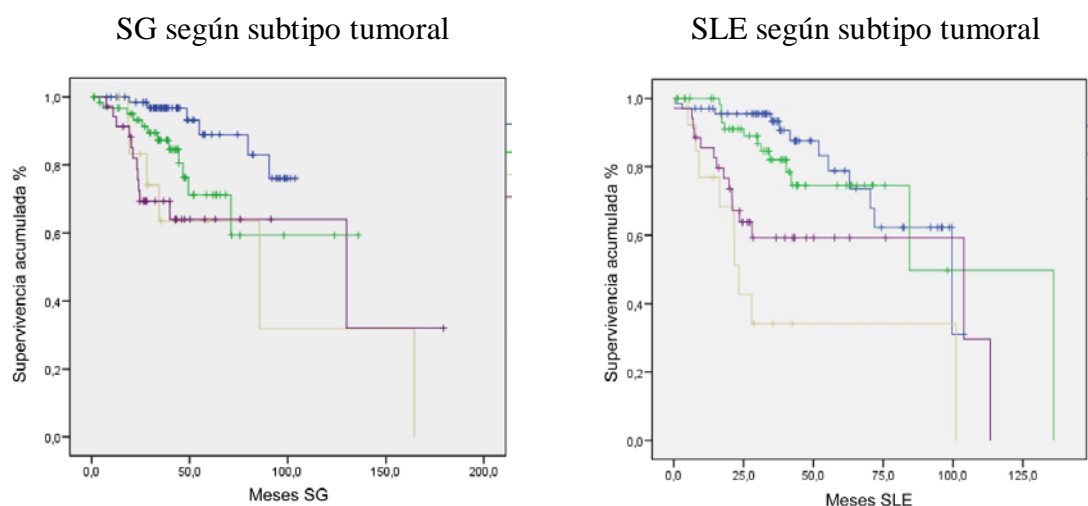


Figura 34. Curvas de SG (izquierda) y SLE (derecha) según el subtipo tumoral. Línea Azul: Luminal A; Línea Verde: Luminal B; Línea Amarilla: HER2 sobreexpresado; Línea Violeta: Triple Negativo.

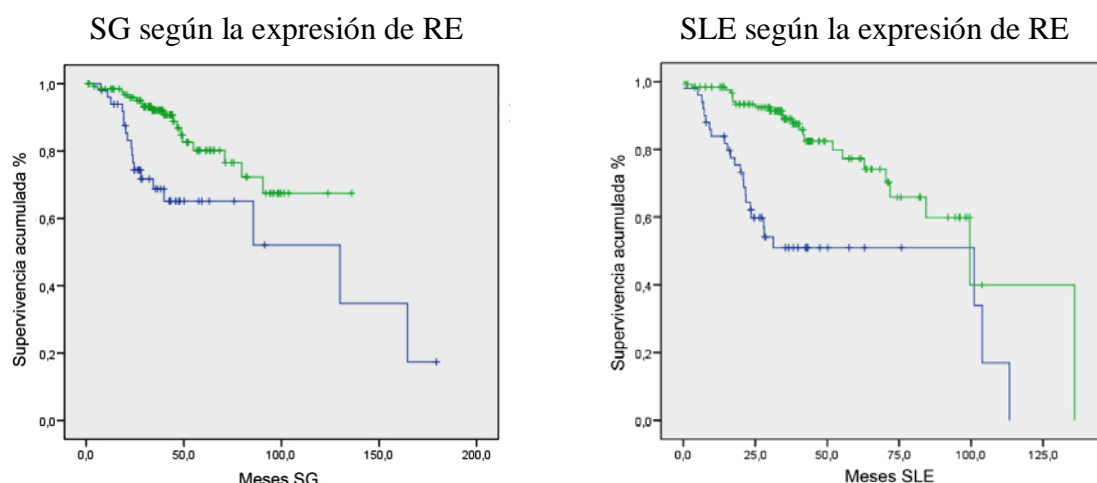


Figura 35. Curvas de SG (izquierda) y SLE (derecha) según la expresión de RE. Línea Azul : RE negativo; Línea Verde: RE positivo.

En cuanto al estudio de SLE en estos tres marcadores, las curvas se comportaron de forma similar a las curvas de SG, con mejores tasas de SLE en los tumores RE+, RP+ y con expresión alta de Bcl2 (Figuras 35 – 37). La SLE a 60 meses en los tumores RE+ fue 77.3% (IC 95%: 66.92 - 87.68) mientras en los casos RE- la SLE fue de 51.0% (IC 95%: 35.91 - 66.09). Respecto a RP la SLE a 60 meses fue del 77.6% (IC 95%: 66.82 - 88.38) en los casos positivos y de 56.9% (IC 95%: 41.41 - 72.38) en los negativos. En los grupos de expresión de Bcl2, las altas expresiones obtuvieron la mejor tasa de SLE con un 77.1% (IC 95%: 66.32 - 87.88) mientras las expresiones bajas y negativas de Bcl2 tuvieron un porcentaje de SLE de 56.4% (IC 95%: 29.94 - 82.86) y 58.8% (IC 95%: 42.54 - 75.06) respectivamente (Figura 37).

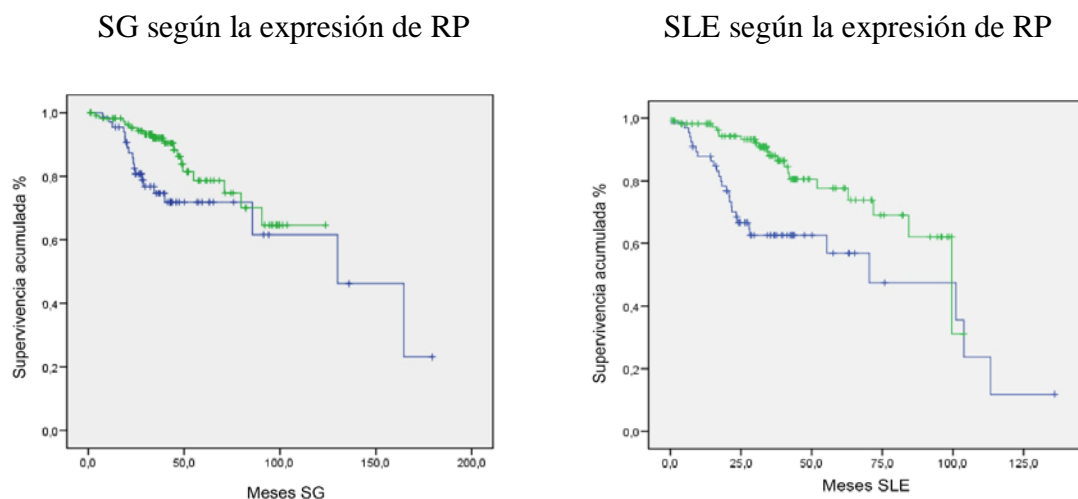


Figura 36. Curvas de SG (izquierda) y SLE (derecha) según la expresión de RP. Línea Azul: RP negativo; Línea Verde: RP positivo.

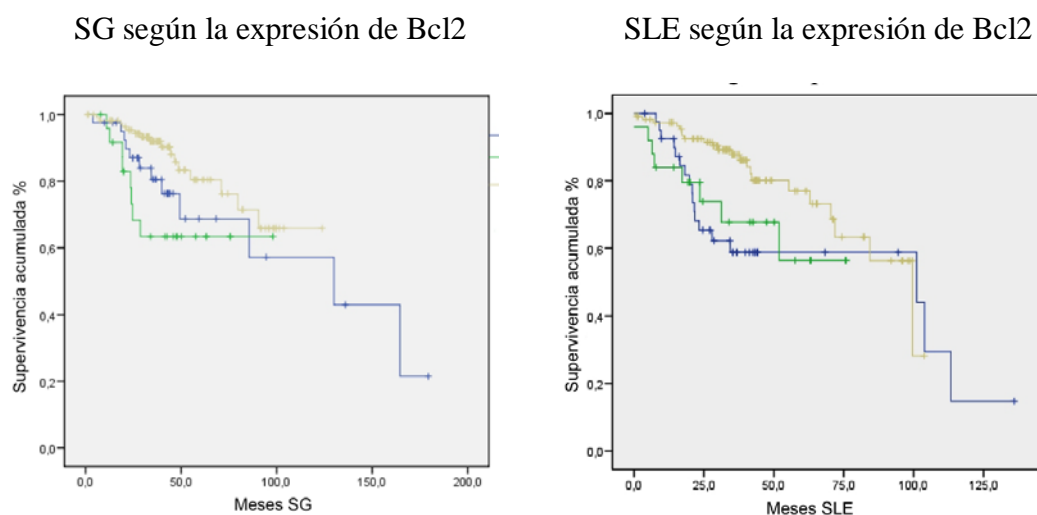


Figura 37. Curvas de SG (izquierda) y SLE (derecha) según la expresión de Bcl2. Línea Azul: Negativo; Línea Verde: Baja Expresión de Bcl2; Línea Amarilla: Alta Expresión de Bcl2.

Otros marcadores que tuvieron asociación significativa con la SG fueron p16 y GDF15. Observamos que los grupos con expresión positiva de GDF15 y las altas expresiones de p16 tenían la menor tasa de SG a 96 meses con un 40.2% (IC 95%: 4.53 - 75.87) para los tumores GDF15 positivos y un 39.9% (IC 95%: 15.6 - 64.2) para los casos con alta positividad para p16. Las valoraciones negativas de GDF15 tuvieron una mejor SG a 96 meses con un 72.1% (IC 95%: 59.17 - 85.03). EL grupo de tumores con expresión baja de p16 tuvo una SG a 96 meses de 77.8% (IC 95%: 57.81 - 97.79) y los tumores negativos de p16 presentaron una tasa de SG del 73% (IC 95%: 51.25 - 94.75) (Figura 38).

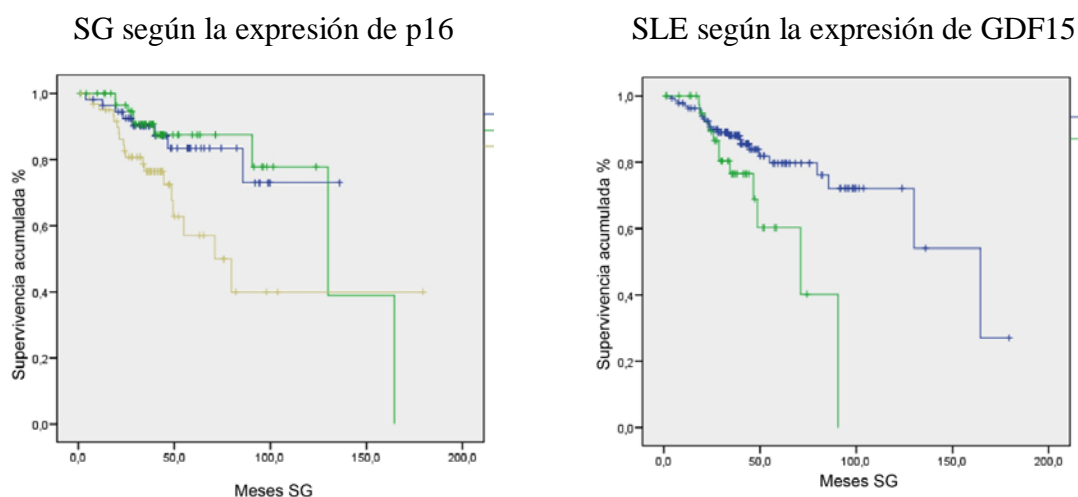


Figura 38. Curva de SG según la expresión de **p16** (izquierda): Línea Azul: Negativo; Línea Verde: Baja expresión de p16; Línea Amarilla: Alta expresión de p16. Curva de SG según la expresión de **GDF15** (derecha). Línea Azul: Negativo; Línea Verde: Expresión positiva para GDF15.

En el análisis de la SLE con otros marcadores encontramos diferencias significativas de la relación con las pruebas de FISH para *CCND1* y *HER2*, pero no con las pruebas IHQs para los mismos marcadores. En ambos casos las amplificaciones del gen (altas amplificaciones de *CCND1* y *HER2* amplificado) obtuvieron la peor tasa de supervivencia, con una SLE a 60 meses de 48.5% (IC 95%: 22.24 - 74.76) en los casos con amplificaciones altas de *CCND1* y de 49.9% (IC 95%: 27.76 - 72.04) en los tumores *HER2* amplificados. La SLE de los tumores sin amplificaciones de *HER2* fue de 73.4% (IC 95%: 63.8 - 83.0) similar a la de los casos no portadores de amplificaciones de *CCND1* que tuvieron un porcentaje de SLE del 71.5% (IC 95%: 61.51 - 81.49). La mejor SLE a 60 meses se observó en el grupo de tumores con amplificaciones bajas de *CCND1* (82.5% con IC 95%: 60.36 - 104.64) (Figura 39). No encontramos diferencias en el estudio de SG con las pruebas FISH para *CCND1* y *HER2*, ni con la expresión de sus correspondientes proteínas.

Encontramos que los carcinomas con alta expresión de GATA3 presentaban mejores tasas de SLE a 60 meses (79.4% con IC 95%: 69.41 - 89.39) que aquellos tumores con expresiones bajas (75% con IC 95%: 45.02 - 104.98) e intermedias (52.7% con IC 95%: 28.39 - 77.0) de GATA3 y tumores negativos para GATA3 (61.5% con IC 95%: 35.04 - 87.96) (Figura 40). En el estudio de la SG en relación con GATA3 no encontramos diferencias significativas.

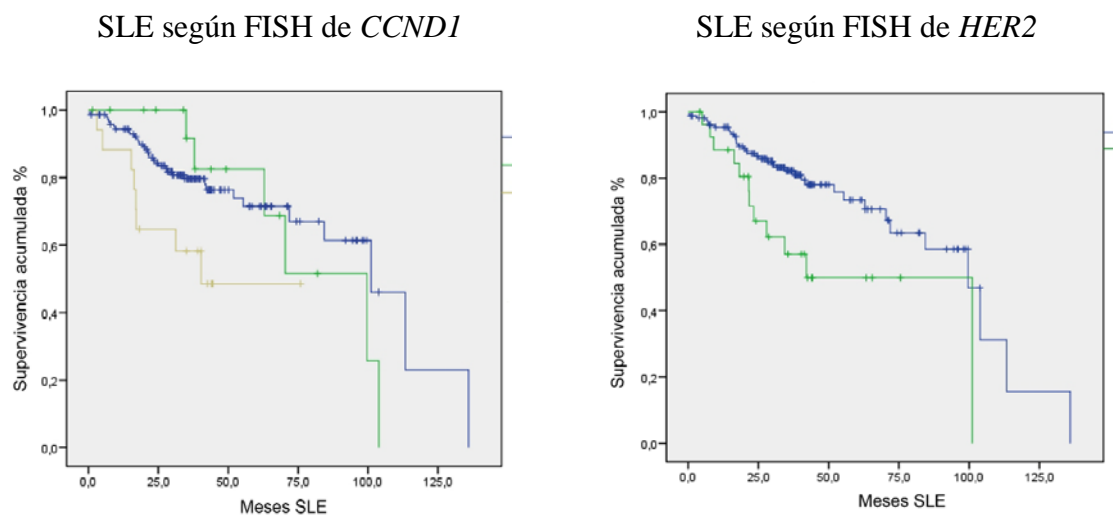


Figura 39. Curva de SLE según el FISH de **CCND1** (izquierda). Línea Azul: Negativo; Línea Verde: Amplificado Bajo; Línea Amarilla: Amplificado Alto. Curva de SLE según el FISH de **HER2** (derecha). Línea Azul: Negativo; Línea Verde: Amplificado.

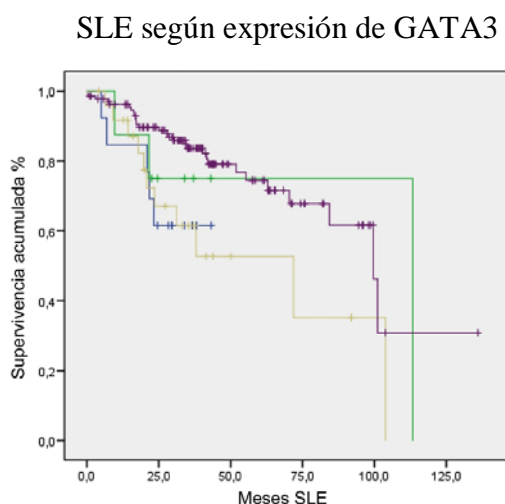


Figura 40. Curvas de SLE según la expresión de GATA3. Línea Azul: Negativo; Línea Verde: Baja Expresión de GATA3; Línea Amarilla: Expresión Media de GATA3; Línea Violeta: Expresión Alta de GATA3.

Finalmente observamos una tendencia sin llegar a ser estadísticamente significativa ($p=0.054$) en la relación de p27 y la SLE. Observamos que a medida que se perdía la expresión de p27 se acortaba la SLE (Figura 41). Con una tasa de SLE a 96 meses en los tumores negativos para p27 de 45,9% (IC 95%: 17.67 - 74.12) mientras en los tumores con expresión positiva baja y alta la SLE fue mayor (54.5% con IC 95%: 20.98 - 88.0 y 63.8% con IC 95%: 43.48 - 80.72, respectivamente).

SLE según expresión de p27

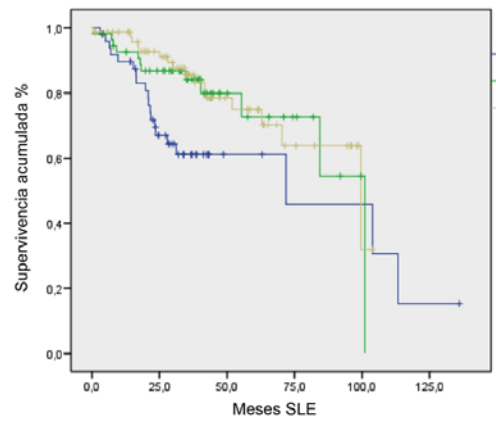


Figura 41. Curvas de SLE según la expresión de p27. Línea Azul: p27 Negativo; Línea Verde: p27 Baja Expresión; Línea Amarilla: p27 Alta Expresión.

No encontramos diferencias significativas en la correlación de la SG ni de la SLE con el índice de proliferación tumoral Ki67 ($p=0,220$ y $p=0,455$ respectivamente), tampoco se observaron diferencias en el estudio con los otros marcadores IHQ incluidos en el estudio.

.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El CIM es una enfermedad neoplásica compleja caracterizada por la diversidad en todos sus aspectos biológicos, clínicos y moleculares. Los factores pronósticos son a su vez múltiples. La clasificación molecular del CIM ha marcado diferencias importantes en cuanto al pronóstico y comportamiento biológico de estas neoplasias (Weigelt *et al*, 2010a; Weigel *et al*, 2010; Patani *et al*, 2013). Uno de los pasos más importantes en la clasificación de los tumores mamarios, fue la distribución de los tumores en dos grandes grupos: los tumores hormonodependientes y los tumores que no expresan genes relacionados con la vía RE (Perou *et al*, 1999). Hoy en día se acepta que estos dos grandes grupos son dos diferentes espectros de la enfermedad con distintos comportamientos, marcadores de riesgo y pronóstico, así como diferentes opciones terapéuticas.

A lo largo de esta última década se han descrito varios subtipos tumorales de CIM que, según su perfil genético, determinan un diferente comportamiento biológico. A pesar de que estos perfiles de expresión génica son considerados como el patrón de oro para definir los diferentes subtipos intrínsecos tumorales, existen limitaciones importantes que promueven la búsqueda de otros métodos de estadificación. En un intento de desarrollar una clasificación técnicamente simple, reproducible y de utilidad clínica se han estudiado diferentes combinaciones de marcadores inmunohistoquímicos derivados de los datos de los perfiles genéticos. La distribución de los diferentes subtipos en nuestro estudio fue la siguiente: 68 casos (38%) Luminal A, 63 casos (35%) Luminal B, 35 casos (20%) Triple Negativo y 13 casos (7%) HER2 Sobreexpresado. Esta distribución coincide con lo descrito en la literatura, siendo los tumores luminales el subtipo más numeroso y diverso dentro del CIM (Cancer Genome Atlas Network, 2012) y el grupo HER2 el menos frecuente. La frecuencia de presentación del subtipo HER2 es menor al porcentaje de tumores con amplificaciones de *HER2* tanto en las series descritas (Chacon *et al*, 2010; Patani *et al* 2013; Choritz *et al*, 2011), como en nuestra serie, donde el 15% de nuestros casos portaban amplificación de *HER2* y sólo la mitad de ellas (13 de 27 casos) se corresponden con tumores del subtipo HER2. Esto se debe a que el resto de tumores con amplificación coexpresaban receptores hormonales, clasificándose como Luminales B.

Nuestra serie muestra un predominio de los tumores hormonodependientes RE+ (72%) y/o RP+ (63%), de tipo histológico no específico que expresan E-cadherina.

En cuanto a los patrones de distribución de los casos incluidos en nuestra serie según los parámetros clínicos, observamos que la mayor parte de los CIM del estudio se ubicaron en edades de 40 a 65 años (60%), tamaños tumorales intermedios (53%), altos grados histológicos (46%) y ausencia de afectación ganglionar (47%) en el momento del diagnóstico, resultados comparables a los descritos en otras series (Rakha *et al*, 2013a; Weigelt *et al*, 2010b; Parl & Dupont, 1982; Moo *et al*, 2014; Han *et al*, 2011; Mylona *et al*, 2013; Pappo *et al*, 2007).

5.1. PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

La subdivisión de los CIM según los grupos de edad ha mostrado diferentes patrones de presentación histológica, expresión de inmunomarcadores y respuestas a los diversos tratamientos. A pesar de que se ha considerado que los CIM en pacientes jóvenes (<40 años) son de peor pronóstico (Leclerc *et al*, 2013; Han *et al*, 2011), en nuestra serie este grupo de pacientes presentó una mayor SG a 60 meses que las pacientes mayores de 65 años (77,6% vs 68,5%). Estos hallazgos son similares a los publicados por el estudio EUROCORE (Sant *et al*, 1998), en donde se observó que el grupo de mujeres jóvenes tenía una supervivencia más elevada. La SG acortada en pacientes mayores de 65 años encontrada en nuestra serie, puede ser atribuida a la existencia de un subgrupo de pacientes mayores de 75 años con alta comorbilidad y tumores localmente avanzados, que recibió tratamientos más conservadores. Pappo *et al* (Pappo *et al*, 2007), ya describieron una serie de pacientes de edad avanzada con tumores de gran tamaño y que se presentaban en estadios clínicos más avanzados. También hay que considerar que la decisión terapéutica en estas pacientes mayores está condicionada por multitud de factores, que influyen en la supervivencia.

Las tasas de SLE del grupo de menores de 40 años fueron menores que las de los otros grupos de edad (46.8% vs 69.2 y 84.5%) de acuerdo con lo descrito por otros autores (Leclerc *et al*, 2013; Han *et al*, 2011). No hemos observado correlación entre la edad de presentación y los diferentes marcadores IHQ estudiados.

Otros factores de riesgo clínico-patológicos conocidos y aceptados en el CIM son el tamaño tumoral, el grado histológico y la afectación ganglionar. Todos ellos tienen valor pronóstico individual pero la integración de sus valoraciones conlleva a una mejor valoración predictiva de cada caso (Weigel & Dowsett, 2010; Rahka *et al*, 2010a). En nuestro estudio observamos que a menor grado histológico y menor afectación ganglionar los tumores mamarios se relacionan con marcadores asociados a la vía RE (FOXA1, CCND1, BCL2, p27) y con grupos tumorales que cursan con un comportamiento biológico menos agresivo (Luminal A) (Tablas 24, 25 y 27).

Todos estos marcadores, a excepción del p27 y Bcl2, tienen biológicamente una función asociada a la transcripción génica mediada por RE en las células tumorales del CIM, actuando como coactivadores o reguladores del RE (Roy & Thompson, 2006; Badve & Nakshatri, 2009, Hurtado *et al* 2011). Esta acción conjunta promueve la proliferación celular, base del proceso neoplásico de estas células, por lo cual es esperable que se coexpresen en los tumores dependientes de la vía RE.

La asociación de Bcl2 con la vía RE se explica por la alta expresión de la proteína en los tumores luminales, los cuales dentro de su marca genética incluyen al gen *BCL2* (Perou *et al*, 2000; Vendrell *et al*, 2008; Cancer Genome Atlas Network, 2012). Sin embargo el mecanismo de sobreexpresión no se ha determinado. Es conocido que el subtipo Luminal A así como la expresión de RE en los CIM es un factor pronóstico favorable y estos tumores presentan mayor SG.

Adicionalmente se observó asociación inversa del GI con marcadores conocidos como de pronóstico adverso como lo son p16, p53 y HER2 (Tablas 25, 27 y 28). Con la afectación ganglionar observamos un comportamiento similar encontrando asociación entre los casos N0 y N1 con los subtipos Luminal A y B, así como con las expresiones positivas de RE, RP, p27, Bcl2 y GATA3 (Tablas 23, 24, 27 y 29).

En el estudio de supervivencia según el grado histológico y tamaño tumoral observamos que los casos GI y T1 tienen mejor SG a 60 meses que los otros grupos (96.3% - GI vs 83.2% - GII y 64.2% - GIII para el grado y 87.7% - T1 vs 57.6% - T2 y 60.0% - T3 para el tamaño). Las afectaciones ganglionares N0 y N1 también mostraron porcentajes de SG y SLE superiores a los grupos/casos N2 y N3. Según diferentes

estudios las valoraciones intermedias del grado, tamaño tumoral y afectación ganglionar son grupos con comportamiento intermedio, que se distribuyen en todos los subtipos tumorales (Rahka *et al*, 2010; Weigelt *et al*, 2010b). Esto lo podemos ver reflejado en nuestra serie, cuando observamos las curvas de SG y SLE asociadas a los parámetros clínicos. Respecto al grado histológico y al tamaño tumoral observamos que los grupos intermedios tienen una SG similar a los grupos con valoraciones menores (GI y T1) en los primeros 24 meses de seguimiento y paulatinamente la curva se va disociando y asemejándose a las curvas de los grupos de mayor grado y mayor tamaño (Figura 30). Debido a que en nuestro estudio tenemos pocos casos con seguimiento clínico mayor o igual a 96 meses (3 casos GI, 6 casos GII y 4 casos GIII), es posible que el comportamiento final de la curva no sea el real y los datos de supervivencia de los GIII a 96 meses deban ser tomados con cautela.

Un caso especial son los tumores del subtipo Luminal B, a pesar de tratarse de tumores asociados a la vía RE presentan un comportamiento más agresivo con porcentajes de SG y SLE menores que sus homónimos del tipo A. En nuestra serie la SG y SLE a 96 meses del subtipo Luminal B fue de 59.3% y 49.7% respectivamente, mientras que en el subtipo Luminal A la SG fue de 76.1% y la SLE de 62.3%. Además se observó que la mayoría de los tumores clasificados como GIII, T3 y N3, fueron igualmente del subtipo tumoral Luminal B (Tablas 21 y 23), demostrando su naturaleza proliferativa, ya descrita en los estudios de perfiles genéticos por Perou *et al*. (Perou *et al*, 2000) (Figura 1).

5.2. BIOMARCADORES

En la distribución de los marcadores IHQ observamos pocos casos positivos para HER2, p63, AURKA, GCDFP-15 y GDF15 (Tabla 20), lo que limitó el análisis estadístico y probablemente no permitió llegar a la significancia estadística en la correlación de la expresión de estas proteínas con otros marcadores o parámetros clínicos.

Los marcadores que mostraron predominio de las valoraciones positivas fueron RE, RP, RA, Bcl2, FOXA1, GATA3, CCND1 y p27, distribución adecuada para una

serie de tumores de CM, ya que la expresión positiva de estos marcadores es característica de los tumores de mama hormonodependientes que son los más frecuentes de la enfermedad. Respecto a las proteínas supresoras de tumores Rb y p53 llama la atención que la distribución de las muestras entre positivos y negativos fue casi equitativa con aproximadamente la mitad de los casos en cada grupo de expresión. Un comportamiento similar se observa cuando valoramos la expresión de p21. Esto demuestra que podemos encontrar alteraciones de expresión de estos marcadores en todos los subtipos tumorales de la serie, tal como se ha observado en otros estudios (Lehn *et al*, 2011;Davalos-Salas & Recillas-Targa, 2011;Caldon *et al*, 2010).

5.2.1. Ki67

La expresión de Ki67 es un marcador de proliferación celular que ha sido ampliamente estudiado como posible marcador pronóstico y de respuesta terapéutica en el CM (Weigelt *et al*, 2010a;Yerushalmi *et al*, 2010). Un 77.1% de los tumores fue considerado Ki67 positivo en nuestro estudio siendo un 52% de ellos positivos altos para Ki67. Aunque no se ha fijado aún el punto de corte preciso entre la alta y baja positividad para este marcador, nosotros utilizamos el 14%, según lo sugerido por el grupo de Cheang (Cheang *et al*, 2009), para la separación entre Luminales A y B. El criterio en la utilización de los niveles de Ki67 para la diferenciación entre subtipos Luminales A y B se basa en la mayor expresión de genes proliferativos en el subtipo Luminal B (Cheang *et al*, 2009; Perou *et al*, 1999).

En nuestro estudio los valores altos de Ki67 se asociaron con altos grados histológicos (Tabla 25), observándose mayores tasas proliferativas en los tumores peor diferenciados, de manera similar a la mayoría de los trabajos revisados. En línea con lo publicado por Kobayashi (Kobayashi *et al*, 2013) no encontramos diferencias significativas entre la expresión de Ki67 y la afectación ganglionar. No obstante, diversas series hacen referencia a la correlación positiva y significativa entre los tumores con elevados índices de Ki67 y el tamaño tumoral y el compromiso ganglionar (Charpin *et al*, 1988;Weikel *et al*, 1991; Wintzer *et al*, 1991; Gaglia *et al*, 1993;).

A pesar de que varios trabajos destacan que la elevada expresión de este antígeno se asocia significativamente con la progresión tumoral y el desarrollo de

enfermedad metastásica, nosotros no hemos observado diferencias significativas en el análisis de la SG ni SLE. En un meta-análisis publicado por Azambuja *et al* en el que se incluyeron 46 estudios con más de 12000 pacientes se encontró que el alto índice de proliferación (Ki67) era un marcador adverso de la SG y SLE tanto en pacientes con y sin afectación ganglionar (Azambuja *et al*, 2007). Este estudio se realizó seleccionando solo los carcinomas de mama incipiente y los puntos de corte utilizados fueron los propuestos por cada autor, con un rango muy amplio (5-34%), lo que podría explicar en parte la diferencia con nuestros resultados.

Hemos observado que los elevados índices de Ki67 se relacionaban de manera significativa con otros marcadores de mal pronóstico o comportamiento tumoral agresivo (HER2, p53, p16, Rb) (Tablas 32, 47, 51, 60), y se asociaba inversamente con RE, RP, Bcl2 y CCND1 (Tablas 33, 43 y 61). Estos datos sugieren que Ki67 podría ser un buen marcador pronóstico, pero para establecer su valor serían necesarios estudios con mayor número de casos. Hoy en día sigue siendo tema de debate si el estudio de Ki67 debe ser incluido en los parámetros predictivos del CIM.

5.2.2. HER2

La vía de señalización de HER2 se ha visto implicada en la tumorigénesis y progresión de los CM. Las alteraciones en esta vía se han asociado a la amplificación del gen *HER2*, factor pronóstico y predictivo reconocido y aceptado hoy en día en el CM (Gutierrez & Schiff, 2011; Harris *et al*, 2007). El estudio de la expresión del gen *HER2* y la presencia de genes asociados a la vía HER2, junto con la ausencia de RE son la base de la firma genética del subtipo molecular HER2 Sobreexpresado (Perou *et al*, 1999; Weigelt *et al*, 2010a).

En la práctica diaria habitual del patólogo, para la detección de las alteraciones de HER2 en tumores mamarios se utiliza la IHQ por su rapidez y sencillez. En múltiples estudios se ha analizado la correlación de la sobreexpresión de HER2 con la presencia de amplificaciones del gen, confirmándose una asociación fuerte, con baja tasas de falsos positivos, lo que ha llevado a que en la actualidad la IHQ sea la técnica admitida por los organismos internacionales como la primera herramienta en la detección de CIM con amplificaciones de *HER2*, de forma que la técnica de FISH o CISH queda

restringida a un pequeño grupo de CM (HER2 2+). Nosotros encontramos dicha asociación entre las dos técnicas (FISH vs IHQ), mostrando correlación de las valoraciones positivas de HER2 con la presencia de amplificaciones, al igual que asociación entre los casos negativos por IHQ con la ausencia de la amplificación del gen. No obstante, obtuvimos 3 casos valorados como negativos para la IHQ, que presentaron amplificación del *HER2*, resultados similares a los obtenidos por Cho *et al*. Estos fallos de la técnica IHQ pueden ser atribuidos a los efectos de una inadecuada fijación de los tejidos, o a errores técnicos en la realización de la prueba, entre otros.

Dentro de nuestra serie la expresión de la proteína HER2 fue positiva en 20 casos (11.2%), 17 casos (9.5%) fueron valorados como *Borderline* y 142 casos (79.3%) fueron negativos (Tabla 20). Respecto al FISH encontramos 27 casos (15.1%) con amplificación del gen.

Los CM con alteración de la vía del HER2 se conocen como tumores altamente proliferativos, con tendencia a las recaídas y asociados a factores pronósticos adversos (Munirah *et al* 2011;Weigel & Dowsett, 2010;Patani *et al*, 2013). Sin embargo, aunque su comportamiento biológico sigue siendo agresivo, las terapias antiHER2 han mejorado sustancialmente la supervivencia de las pacientes con estos tumores (Patani *et al*, 2013;Dowsett *et al* 2009;Bozza *et al* 2013). En nuestros resultados observamos que los tumores con amplificaciones de *HER2* así como los casos con sobreexpresión de la proteína presentaron asociación con los grados histológicos III. Respecto a las afectaciones ganglionares los casos N0-N2 se asociaron a la ausencia de amplificaciones, y un alto porcentaje de casos dentro del grupo N3 presentaba amplificación del gen *HER2*. No se encontró asociación entre la expresión de la proteína con el tamaño tumoral, la afectación ganglionar ni el grado histológico.

La sobreexpresión de la molécula de HER2 está descrita en tumores más agresivos (Traina *et al*, 2006), que se caracterizan por tener un alto índice de proliferación celular. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio, donde observamos una asociación de la expresión positiva de HER2 con los altos índices de Ki67.

En el análisis de supervivencia, encontramos una SLE acortada en los tumores del subtipo HER2 Sobreexpresado (SLE a los 96 meses de 34,2% vs 49,7% Luminal B, 59,3% Triple Negativo y 62,3% Luminal A). Los tumores con amplificaciones de *HER2* mostraron también una menor SLE; 49,9% el grupo con *HER2* amplificado mientras que el porcentaje de SLE de los no amplificados fue del 58,6%. El análisis de SG para HER2 IHQ y *HER2* FISH no mostró diferencias significativas.

En el CM existe una relación inversa entre la sobreexpresión de HER2 y los receptores hormonales de estrógeno y progesterona (Hoang *et al*, 2000; Gusterson *et al*, 1992), por ello en las pacientes con RE negativo la frecuencia de amplificación de *HER2* es mayor en comparación con aquellas que son RE positivo. Esto se observó también en nuestro estudio (Tabla 40). Sin embargo, la mitad de los tumores con amplificación de *HER2* de nuestra serie eran RE+ (14 de 27), es decir, pertenecían al subtipo Luminal B. De manera similar, encontramos una asociación entre la amplificación de *HER2* y la ausencia de expresión de RP, de los 27 casos *HER2* amplificado, 19 (un 70%) no mostraban expresión de RP (Tabla 40). Este dato es interesante ya que la pérdida de RP en las células tumorales se ha descrito como factor de mal pronóstico.

Respecto a los marcadores asociados a la vía RE, BCL2, p27 y FOXA1; encontramos que la ausencia de amplificaciones se correlacionaba con la alta expresión de estos marcadores, como se ha descrito previamente.

El factor de transcripción FOXA1 modula la proliferación celular mediante la regulación de RE y de otros factores de transcripción como RA. Recientemente se ha descrito un nuevo subtipo de CM, el Apocrino Molecular, son tumores RE negativos cuyas células expresan RA. Dentro de este subgrupo es frecuente la expresión de FOXA1 el cual, además presenta una alta frecuencia de presencia de amplificaciones de *HER2*. Dentro de nuestra serie observamos que de 13 casos con amplificaciones de *HER2* y RE negativos, 6 mostraban positividad para RA. Estos mismos 6 casos eran positivos para FOXA1, identificando por tanto un grupo de casos con el perfil ER-/HER2+/FOXA1+/RA+, que se incluirían en el subtipo Apocrino Molecular, previamente descrito con este perfil característico (Naderi *et al*, 2012; Park *et al*, 2010; Farmer *et al*, 2005).

En nuestro análisis también hemos observado que las amplificaciones de *HER2* se distribuyeron en su mayoría en los grupos de expresión de p27 negativo y bajo, demostrando su carácter proliferativo, ya que la baja expresión o negatividad de p27 indican una inefectiva inhibición del ciclo celular y se han asociado a procesos neoplásicos de peor comportamiento biológico y mal pronóstico (Zhang *et al*, 2010).

Un factor importante implicado en el ciclo celular es Rb, cuya función es inhibir la progresión del ciclo actuando en el punto de control G1-S impidiendo que las células con el ADN dañado progresen en el ciclo celular. La sobreexpresión de Rb se ha asociado a neoplasias con alto índice de proliferación. En los CM su valor pronóstico no está claro, ya que su comportamiento es diferente en los tumores RE- y RE+. En nuestro análisis observamos que tanto las expresiones positivas de HER2 como la presencia de amplificaciones del gen se asociaron a la sobreexpresión de Rb.

Por todo lo anteriormente expuesto nuestros resultados confirman el carácter agresivo de los tumores con alteraciones de la vía HER2.

5.2.3. Receptor de andrógenos

El RA es un receptor hormonal que se expresa ampliamente en todos los CM, con mayor expresión en los tumores RE+/RP+ y asociado clásicamente a mejor pronóstico clínico en los tumores luminales (Park *et al* 2010;Peters *et al*, 2009;Robinson *et al*, 2011). En nuestro estudio observamos que el 57% de los casos expresaron RA y al igual que en el resto de las series, se encontró asociación fuerte ($p<0.001$) con la expresión de los otros receptores hormonales (Tabla 45).

La frecuencia de expresión de RA varió significativamente con el subtipo molecular, encontrando expresión de RA en aproximadamente un 70% de los subtipos luminales, en un 46% de los casos HER2 Sobreexpresado, y finalmente solo un 17% de los Triple Negativo fueron positivos para RA. A pesar de que la expresión de RA se encuentra estrechamente ligada a la expresión de RE, encontramos que la expresión de RA es frecuente en tumores del grupo HER2 que son RE negativos, de manera similar a lo descrito por Collins (Collins *et al*, 2011). En el recientemente descrito subtipo Apocrino Molecular se describen tumores RA positivos/RE negativos que tienen

además una alta asociación con amplificaciones de *HER2* (Naderi *et al*, 2012;Farmer *et al*, 2005). Estos tumores (subtipo Apocrino Molecular) son dependientes de FOXA1 para que RA se una a la cromatina y realice su actividad transcripcional (Robinson *et al*, 2011), por lo que el desarrollo de este tipo de tumores necesita de los dos factores. Esto nos explicaría la fuerte asociación encontrada entre FOXA1 y RA ($p<0.001$, tabla 46) de nuestro estudio.

El efecto de los andrógenos en el CM no se conoce. La acción de RA en los tumores hormonodependientes parece tener un efecto inhibitorio del crecimiento y la proliferación celular, que esta mediada por la unión de RA a los mismos sitios de unión del RE al ADN, impidiendo físicamente la transcripción del RE. Algunos autores sugieren que los estrógenos y los andrógenos tienen efectos opuestos y que los andrógenos jugarían un papel protector respecto al desarrollo tumoral (Labrie, 2007), asociando los casos negativos a mayores tamaños tumorales, alto grado y afectación ganglionar. Nosotros, sin embargo, no hemos encontrado asociación de la expresión de RA con factores clínicos ni en el estudio de supervivencia, por lo que no podemos inferir su valor pronóstico en nuestro estudio.

5.2.4. Bcl2

Los genes asociados a la apoptosis *BCL2* y *p53* han sido objeto de estudio en múltiples neoplasias, así como la expresión de sus respectivas proteínas, que suelen estar asociadas a pronóstico desfavorable en la mayoría de los procesos neoplásicos. En el CM el gen *BCL2* forma parte del perfil genético del subtipo luminal, y consistentemente la expresión de la proteína Bcl2 se asocia a la expresión de RE (Callagy *et al*, 2008, Thomadaki *et al*, 2007). Esta asociación la observamos en nuestro estudio, donde encontramos que un 93.8% de tumores con expresión alta para Bcl2 coexpresaba RE (Tabla 60). Así mismo, Bcl2 se correlacionó de forma directa con los otros marcadores asociados a los tumores RE+ (RP, CCND1, p27, FOXA1, GATA3 y RA) y de forma inversa con p53, HER2 y la presencia de amplificaciones de *HER2* (Tablas 41, 43, 45, 47 y 61), lo que indica un mejor comportamiento biológico dentro de todos los CM (Vendrell *et al*, 2008;Abdel-Fatah *et al*, 2013;Barghava *et al*, 1994). Observamos además que la negatividad de Bcl2 se asoció al subtipo HER2 Sobreexpresado.

Múltiples autores han valorado el papel pronóstico de Bcl2 en los tumores RE+ (Vendrell *et al*, 2008; Kim *et al*, 2012) y aunque existen estudios en tumores RE negativos (Abdel-Fatah *et al*, 2013; Callagy *et al*, 2008), estos son escasos y presentan resultados discordantes. En el análisis de supervivencia realizado en nuestro estudio, encontramos mejores tasas de SG y SLE a los 60 meses en los tumores con expresiones altas de Bcl2 en comparación con los grupos de expresión baja y negatividad, lo que le confiere un valor pronóstico favorable (80,4% de SG y 77,1% de SLE en el grupo de alta expresión versus SG y SLE menores del 70% y 60% respectivamente en los otros grupos de expresión de Bcl2) (Figura 37). Este comportamiento de los tumores Bcl2+ se ha observado tanto en carcinomas RE positivos como en tumores RE negativos en estudios previos. Otros datos que apoyan el papel pronóstico favorable de Bcl2 en nuestra serie, fue la correlación de las altas expresiones de Bcl2 con los grados histológicos bajos e intermedios, así como la ausencia de expresión de Bcl2 y la afectación ganglionar N3. En un metaanálisis reciente (Callagy *et al*, 2008) se apoya el papel pronóstico de la expresión de Bcl2 medido por IHQ y muestra mejores tasas de SG y SLE, en el grupo con expresiones altas de Bcl2, al igual que en nuestro estudio. A pesar de estas apreciaciones, Bcl2 todavía no está admitido por la ASCO como marcador pronóstico independiente en el CIM, por lo que son necesarios grandes estudios prospectivos para establecer su utilidad clínica.

5.2.5. Proteína p53

En esta serie detectamos alta expresión de la proteína p53 en un 22% de los casos (Tabla 20) y baja expresión en el 25%, siendo negativos un 53% de los casos. En el CM los porcentajes de positividad para la p53 varían entre un 30-40% (Rossner *et al*, 2009), presentando una gran variabilidad en función al anticuerpo empleado y el punto de corte establecido. En nuestro estudio valoramos la expresión de p53 en alta y baja expresión con el fin de poder teóricamente diferenciar los casos que fueran más susceptibles de ser portadores de mutaciones de *p53*.

En general, las alteraciones de p53 se han descrito en todos los subtipos de CIM con un papel predominante en los tumores Triple Negativos. Las mutaciones de *p53* suelen encontrarse en los subtipos Triple Negativo/Similar a células basales, Luminal B y los tumores con alteraciones genéticas tipo BRCA1 (Badve *et al*, 2011; Cancer

Genome Atlas Network, 2012;Dumay *et al*, 2013;Elsawaf *et al*, 2013a;Korsching *et al*, 2008;Millar *et al*, 2011;Shan *et al*, 2013). De acuerdo con lo descrito, en nuestro análisis encontramos que las expresiones altas de la proteína se distribuían principalmente en los subtipos Luminal B y Triple Negativo (un 22% y 66% de las expresiones altas respectivamente, tabla 34).

Un gran número de estudios (Bertheau *et al*, 2013;Desmedt *et al*, 2012;Dumay *et al* 2013), han analizado el efecto de las mutaciones de *p53* en el CM, y describen que la presencia de mutaciones se asocia a peor supervivencia, aunque la mayoría de ellos están basados en series pequeñas de casos. En nuestro estudio no encontramos asociación entre la expresión de *p53* y la supervivencia, lo que apoyaría el trabajo de Rossner (Rossner *et al*, 2009), quien realizó un estudio de mutaciones y expresión de *p53* en una serie larga de CM, sin encontrar efecto de las mutaciones en la supervivencia. Sí encontramos una asociación entre la expresión de *p53* y la alta proliferación celular (Ki67) y sobreexpresión de Rb (Tabla 47). En la misma línea, encontramos una asociación entre la negatividad para RE/RP y la sobreexpresión de la proteína *p53*, de acuerdo con lo descrito por otros autores (Rossner *et al*, 2009).

Se conoce que una de las funciones de *p53* es actuar como un regulador de *p21* en el ciclo celular. Numerosos estudios (Ellis *et al*, 1997;Ozelik *et al*, 1995;Barbareschi *et al*, 1996) han examinado la relación entre *p53* y *p21* en CM con resultados muy diferentes. De acuerdo con el grupo de Ellis, en nuestro trabajo encontramos que la alta expresión de *p53* se asocia con la ausencia de expresión de *p21* (Tabla 47), muy probablemente debido a que la pérdida de función de *p53* provoca la ineficaz regulación de la expresión de *p21* (Ellis *et al*, 1997).

5.2.6. Proteína retinoblastoma (Rb)

La proteína Rb es uno de los mayores reguladores del ciclo celular, siendo clave en el mantenimiento del arresto celular en la fase G1. Las alteraciones de la vía p16-ciclinaD1-CDK4/6-Rb se han implicado en la mayoría de las neoplasias así como en los diferentes subtipos de CIM (Peurala *et al*, 2013;Lehn *et al*, 2011;Ertel *et al*, 2010). Tanto la sobreexpresión como la pérdida de expresión de la proteína se han relacionado con procesos patológicos involucrados en la tumorigénesis. En el CM la vía Rb se

inactiva por diversos mecanismos como son las mutaciones o pérdida de heterocigosidad del gen *RBI*, sobreexpresión o amplificación de *CCND1* o inactivación de p16/*CDKN2A*. Estos dos últimos fosforilan la proteína Rb silenciándola y promoviendo la proliferación celular (Ertel *et al*, 2010;Davalos-Salas & Recillas-Targa, 2011;Kumar *et al*, 2012).

En nuestra serie observamos que aproximadamente la mitad de los casos mostraba expresión positiva para Rb y la otra mitad era negativa (52% y 47.5% respectivamente) (Tabla 20). La positividad de Rb se asoció significativamente a los subtipos Luminal B y HER2 Sobreexpresado, habiendo una correlación entre la negatividad para Rb y los subtipos Luminal A y Triple Negativo (Tabla 34). Se ha descrito que el subtipo Luminal A presenta la menor frecuencia de alteraciones de Rb. La pérdida de expresión de Rb ha sido descrita por otros autores en los tumores del subtipo Triple Negativo (Cancer Genome Atlas Network, 2012;Ertel *et al*, 2010;Jiang *et al*, 2010;Jiang *et al*, 2011;Lehn *et al*, 2011).

Con el fin de definir el impacto y la regulación de la vía Rb en los CM, Ertel *et al*, recopiló datos de expresión génica (bases públicas de *microarrays*) de una cohorte de 2254 carcinomas de mama, y encontró que la perdida de función de Rb, así como su pérdida de expresión era diferente en los tumores RE+ al de los tumores RE-. Las principales alteraciones en la función de Rb se han descrito en los tumores RE-, en los que además se encuentra una sobreexpresión de *CDKN2A*/p16. Subhawong (Subhawong *et al*, 2009) describió un fenotipo muy característico del subtipo Triple Negativo, caracterizado por la pérdida de expresión de Rb y altas expresiones de p16. Este perfil de expresión lo hemos confirmado en nuestro subtipo Triple Negativo, donde la negatividad de Rb se asocia estrechamente con expresión fuerte de p16. Por el contrario, en nuestra serie no encontramos correlación de la pérdida de expresión de Rb con los tumores RE-, debido básicamente a un alto porcentaje de casos del subgrupo Luminal A con valoraciones negativas para Rb (61.7%).

En nuestro trabajo encontramos que la sobreexpresión de Rb se asociaba con altos niveles de Ki67 (Tabla 60), lo que indica su papel en la proliferación neoplásica del CIM. Esta asociación entre Rb y Ki67 puede apoyar la correlación del subtipo

Luminal B y la sobreexpresión de Rb en nuestros resultados, ya que el subtipo Luminal B se compone de tumores con Ki67 alto.

Igualmente la positividad de Rb se asoció de forma directa con p53, lo que demuestra que las alteraciones de las dos vías pueden coexistir en los tumores mamarios y que, según algunos autores, esta coexpresión confiere un peor comportamiento biológico, siendo tumores mucho más proliferativos que aquellos que solo tienen una de las dos proteínas sobreexpresada (Elsawaf *et al*, 2013a; Jiang *et al*, 2011; Kumar *et al*, 2012). Adicionalmente observamos que la expresión positiva de Rb se asoció a la alta expresión de marcadores asociados a los tumores RE+ (FOXA1, GATA3 y p27 – ver tablas 55 y 60) y alta expresión de p21 (proteína regulada por p53 – ver tabla 52).

En el análisis estadístico no encontramos diferencias en el estudio de supervivencia ni en la correlación de la expresión de Rb con los parámetros clínico-patológicos, por lo cual no fue posible inferir su valor pronóstico en nuestra serie.

5.2.7. Ciclina D1

El papel de CCND1 como marcador pronóstico y predictivo en el CIM es un tema de debate en la actualidad, con trabajos que lo asocian con buen pronóstico y otros que afirman que su expresión en el CIM está asociada a menores tasas de SLE en tumores hormonodependientes, así como a resistencias en los tratamientos hormonales.

La sobreexpresión de la proteína CCND1 se observó en el 81,6% de los casos de nuestro estudio, sin embargo sólo el 19% de los tumores de la serie portaban amplificaciones de *CCND1*. Estos resultados son concordantes con lo descrito en la literatura médica, donde se encuentra una prevalencia de la expresión de la proteína del 28% al 82% y hasta el 20% de presencia de amplificaciones *CCND1* (Reis-Filho *et al*, 2006; Roy *et al*, 2006; Mu *et al*, 2011; Mylona *et al*, 2012).

Respecto a los factores clínicos encontramos que la alta expresión de CCND1 en los CIM del estudio se correlacionó con grados histológicos bajos e intermedios y con las afectaciones ganglionares bajas (Tabla 24).

En nuestra serie observamos una fuerte asociación entre la positividad para CCND1 ($p < 0,001$) y la expresión de RE/RP, así como, asociación entre la presencia de amplificaciones de *CCND1* ($p = 0,002$) y los subtipos tumorales Luminal A y Luminal B (Tablas 35 y 43). La alta expresión de CCND1 se correlacionó con alta expresión de p27, Bcl2, FOXA1 y GATA3 (Tablas 42 – 44), todos estos marcadores ligados a la vía biológica del RE, lo que apoya la alta frecuencia de la expresión de CCND1 en los tumores hormonodependientes que a su vez son considerados de buen pronóstico (Cho *et al*, 2008a; Roy *et al*, 2006; Tobin *et al*, 2012); un 93% de los casos RE+ de nuestra serie sobreexpresaban CCND1.

La positividad de CCND1 se correlacionó inversamente con p53 (Tabla 43), lo que sugiere que el grupo de tumores con sobreexpresión de CCND1 presenta escasas alteraciones de p53 y por lo tanto mejor comportamiento biológico.

El papel proliferativo de la CCND1 dentro del ciclo celular y como activador/regulador del RE hace plantearse que la sobreexpresión y las alteraciones genéticas de CCND1 pudieran estar asociadas a peor pronóstico clínico. En el estudio, la presencia de amplificaciones altas *CCND1* se correlacionaron positivamente con los altos niveles de Ki67, dato que apoya su naturaleza proliferativa. Adicionalmente observamos que una alta frecuencia de casos no amplificados (50,4%) y con ausencia de expresión de CCND1 (69,7%) presentaban altos índices de Ki67 (Tablas 37 y 43). Resulta interesante el hallazgo de que un alto porcentaje de tumores con altos índices de Ki67 (47.3%) fueron a su vez tumores con expresión alta de CCND1 y en su mayoría RE+ (39 de 44 casos). En un análisis por subgrupos RE+ *versus* RE-, evidenciamos que más del 80% de los casos con ausencia de expresión de CCND1, así como un alto porcentaje (43,8%) de los casos no amplificados con altos índices de Ki67 eran a su vez RE negativos. Esto confirma que los tumores RE negativos con altos índices de proliferación celular infrecuentemente presentan alteraciones de la CCND1, como se ha descrito en la mayoría de las series (Mylona *et al*, 2013; Tobin & Bergh, 2012).

Según Mylona *et al*, la expresión de CCND1 en los CIM RE- y en los tumores Triple Negativos es un factor pronóstico favorable con mejores tasas de SG y SLE. Otros autores determinan menores tasas de SG y SLE asociadas con la presencia de amplificaciones de *CCND1* y la sobreexpresión de la proteína en tumores RE+ (Mu *et*

al, 2011; Roy *et al*, 2010), demostrándose que el comportamiento del marcador es diferente en los diversos grupos tumorales y además apoya la teoría de heterogeneidad biológica de estos carcinomas.

En nuestro estudio la expresión de *CCND1* no se asoció con diferencias en las tasas de supervivencia (SG ni SLE). En cambio, si encontramos que las altas amplificaciones se asociaban a menor SLE (48.5% a 60 meses) frente a un 70% de los casos sin alta amplificación (Figura 39). Estas apreciaciones han sido observadas por otros grupos, por lo cual se acepta que los tumores con amplificación de *CCND1* conllevan peor comportamiento biológico (Roy *et al*, 2010). Se encontró una asociación inversa con la expresión de p16, factor adverso ya conocido en la enfermedad (Tabla 42).

Respecto a los resultados de las técnicas de FISH utilizadas en la búsqueda de amplificaciones de *CCND1*, hemos considerado únicamente a los tumores con alta amplificación como amplificaciones reales. Esto fue determinado debido a que se ha demostrado que gran parte de los CM con amplificación baja de *CCND1*, tienen de base otro tipo de alteraciones genéticas como polisomías del cromosoma 11 u otras alteraciones cromosómicas estructurales como: duplicaciones parciales o translocaciones no balanceadas (Roy *et al*, 2010).

En nuestro estudio observamos que la correlación entre las dos técnicas fue significativa ($p=0.003$) (Tabla 37), sin embargo al igual que en otras series, obtuvimos un alto número de casos con sobreexpresión de la proteína que no presentaban alta amplificación del gen, lo cual indica que la IHQ a pesar de ser una excelente prueba en la demostración de la sobreexpresión de la proteína, presenta limitaciones en la detección específica de tumores con amplificación de *CCND1*.

5.2.8. Proteína inhibidora de CDK p16

La proteína supresora de tumores p16 es uno de los marcadores implicados en el control del ciclo celular y se ha asociado al proceso de tumorigénesis de múltiples neoplasias al igual que Rb y p53 (Peurala *et al*, 2013; Shan *et al*, 2013; Silva *et al*, 2003). Su función inhibitoria de los complejos ciclina-CDK, conlleva al mantenimiento del

arresto celular en las células normales. La inactivación de p16 tiene como resultado la pérdida de la inhibición de la fosforilación de Rb, favoreciendo la proliferación celular, siendo un evento común en casi la mitad de todos cánceres humanos. La importancia de la sobreexpresión de p16 no se conoce completamente y su expresión varía en función del tipo de cáncer, lo que ha hecho que se asocie tanto con mejor como con peor pronóstico según el tipo tumoral.

En los tumores de mama del presente estudio observamos un alto porcentaje (79.2%, ver tabla 20) de sobreexpresión de la proteína, si bien la expresión alta la encontramos en aproximadamente el 30% de los casos.

Dentro de los subtipos tumorales encontramos una asociación de las altas expresiones de p16 con el subtipo Triple Negativo (66%) y de la ausencia de expresión de p16 con el subtipo Luminal A (21%, ver tabla 34). Este porcentaje concuerda con otros estudios que obtuvieron porcentajes de expresión de la proteína entre 55% y 77% (Peurala *et al*, 2013;Shan *et al*, 2013), mostrando una asociación con el subtipo molecular similar a células basales y/o tumores Triple Negativos (Bohn *et al*, 2010;Lee *et al*, 2012;Milde-Langosch *et al*, 2001;Peurala *et al*, 2013;Shan *et al*, 2013).

En el CM la sobreexpresión de p16 se ha asociado con factores pronósticos adversos como alto grado histológico, mayor tendencia a las metástasis ganglionares, alta tasa de proliferación celular y sobreexpresión de p53 (Emig *et al*, 1998;Han *et al*, 2001;Shan *et al*, 2013). Igualmente en nuestro estudio, observamos una asociación entre la alta expresión de p16 y los tumores GIII, alta expresión de p53 (Tabla 48) y alto índice de Ki67 (Tabla 51) (marcadores asociados al subtipo Triple Negativo). La expresión negativa o baja de p16 se correlacionó significativamente con la positividad para RE, RP, y con alta positividad de CCND1, GATA3 y FOXA1 (Tablas 42 y 50), es decir con marcadores que en la mama se consideran de buen pronóstico.

De modo similar a lo publicado por otros autores (Lee *et al*, 2012;Milde-Langosch *et al*, 2001;Shan *et al*, 2013;Silva *et al*, 2003), en nuestra serie p16 también se expresa en tumores luminales, lo que sugiere que las alteraciones de p16 se encuentran en todos los tipos de tumores por ser un importante supresor del ciclo celular. Debido a

su relación con factores de mal pronóstico se podría pensar que la sobreexpresión de p16 dotaría de un comportamiento más agresivo a los tumores luminales.

El papel pronóstico de la sobreexpresión de p16 en el CM es un punto de controversia. En los nuevos estudios de subtipificación de tumores Triple Negativos, p16 es un marcador en la clasificación de los tumores tipo Basal A, los cuales tienen un pronóstico mejor dentro de los Triple Negativos (Elsawaf *et al*, 2013b). Peurala *et al*, al igual que Choi (Choi *et al*, 2013) muestra una asociación entre la sobreexpresión de p16 y una mayor SLE y SG en series con diversidad de subtipos tumorales, mientras que otros autores obtienen resultados contrarios (Han *et al*, 2001; Milde-Langosch *et al*, 2001), o bien no encuentran diferencias con respecto a la supervivencia (Lee *et al*, 2012). En nuestro trabajo observamos que la sobreexpresión de p16 se asociaba a menor tasa de SG a los 96 meses: 39.9% en el grupo de alta expresión frente a más del 70% en los grupos negativos o con baja expresión de p16 (Figura 38). Lo que nos lleva a concluir que en nuestra serie p16 se comporta como un marcador de mal pronóstico. No observamos diferencias significativas en la SLE.

5.2.9. Proteína inhibidora de CDK p21

La proteína p21 es un regulador negativo del ciclo celular que ejerce su acción mediante la inhibición de los complejos ciclina-CDK y se ha implicado en la diferenciación y proliferación celular (Caldon *et al*, 2010), así como en el mantenimiento del secuestro del ciclo celular. Su acción en las células neoplásicas es variable observándose diferente patrón de expresión según el tejido valorado (Al-Khalaf & Aboussekhra, 2013; Caldon *et al*, 2010). En el CM también se ha encontrado diversidad en la expresión de la proteína (Caldon *et al*, 2010; Ellis *et al*, 1997; Pellikainen *et al*, 2003).

La distribución de la expresión de p21 en nuestro estudio mostró un 51,9% (93 casos) de tumores negativos y un 48,1% (86 casos) positivos. La positividad fue dividida en baja expresión y alta expresión con 42 y 44 casos en cada grupo respectivamente (Tabla 20). En nuestro trabajo solo hemos valorado la expresión nuclear de p21.

La regulación de la acción de p21 se realiza por varias vías, la más reconocida es la regulación realizada por p53, que cuando se encuentra alterada en el CIM produce un funcionamiento ineficaz de p21 con ausencia de la expresión de la proteína (asociación inversa ya descrita en el apartado p53) (Pellikainen *et al*, 2003). Es probable que en los CIM se activen diferentes vías de regulación de p21, una asociada a p53 y una segunda vía de control no relacionada con p53. En nuestros resultados encontramos que la mayoría de los casos p21 negativos eran a su vez p53 negativos, esto podría explicar la existencia en nuestra serie de grupos tumorales con vías diferentes de regulación de p21 (Tabla 47).

Otro de los marcadores con estrecha relación biológica con p21 es la CCND1, no sólo por la acción inhibitoria de p21 sobre CCND1, sino porque en las células neoplásicas la CCND1 sobreexpresada ejerce un secuestro citoplasmático de p21 y p27, manteniéndolas inactivas y promoviendo la proliferación celular (Caldon *et al*, 2010; Roy & Thompson, 2006). Lo anteriormente expuesto concuerda con el hecho de que en nuestro estudio encontramos una fuerte ($p=0.002$) asociación entre las valoraciones positivas de p21 y las altas expresiones de CCND1 (Tabla 42).

Hemos encontrado que la expresión alta de p21 se relacionó con alta actividad proliferativa (Ki67 - tabla 52), siendo la mayoría de estos casos CM de tipo luminal (RE+). Esto es similar a lo descrito por Pellikainen *et al*, la mayoría de los casos positivos para p21 eran RE+ con un alto índice de proliferación celular (Pellikainen *et al*, 2003). Esta correlación guarda un sentido biológico ya que los tumores hormonodependientes son los CIM con mayor frecuencia de sobreexpresión de CCND1. Otros datos que apoyan la asociación de la sobreexpresión de p21 con los tumores RE+ es la correlación encontrada con las altas expresiones de marcadores asociados a los tumores luminales como GATA3, FOXA1 y p27 (Tablas 52 y 53).

El papel pronóstico de p21 en el CIM no se ha establecido. Existen varios trabajos con resultados contradictorios. En nuestro trabajo no hemos visto que tenga significancia pronóstica, posiblemente porque la red regulatoria de p21 es extremadamente compleja en el CIM, lo que dificulta su estudio.

5.2.10. Proteína inhibidora de CDK p27

La proteína p27 es un inhibidor de CDK implicado en la diferenciación celular, la apoptosis y proliferación celular mediante el control del ciclo celular realizado por su acción inhibitoria sobre los complejos ciclina-CDK (Tang *et al*, 2013;Caldon *et al*, 2010). En las células del CM, el nivel de expresión de p27 por lo general disminuye durante el desarrollo y progresión del tumor. La inhibición de la acción de p27 y su pérdida de expresión nuclear se realiza mediante la fosforilación de la proteína, que promueve la degradación nuclear de p27, así como su exportación al citoplasma celular, donde no puede ejercer su efecto inhibitorio sobre el ciclo celular (Zhang *et al*, 2010). Sin embargo, en los CIM el secuestro de p27 también se realiza mediante la acción de CCND1, lo que conlleva a la sobreexpresión citoplasmática de la proteína. (Caldon *et al*, 2010;Roy *et al*, 2006).

En nuestro estudio el 27% de los casos habían perdido la expresión de p27, un 30% mostraba expresiones bajas y encontramos alta expresión en su mayoría de localización citoplasmática en más del 40% de los casos (Tabla 20). La alta frecuencia de expresiones altas de p27 en nuestra serie puede explicarse por la alta prevalencia de tumores RE+/RP+ que son los carcinomas con más alteraciones en la función de la CCND1 y que por lo tanto expresan p27 en el citoplasma. Además, la alta expresión de p27 se asoció significativamente con las altas expresiones de CCND1 así como con tumores con receptores hormonales positivos y la expresión de Bcl2, FOXA1, y GATA3 (Tablas 42, 54 y 55), todos ellos marcadores asociados los CM hormonodependientes y por lo tanto de buen pronóstico. Por el contrario, la pérdida de expresión de p27 aparece en los tumores que no expresan los receptores hormonales (RE- y RP-).

Según Caldon *et al* y Colozza *et al*, la disminución o ausencia de expresión nuclear de p27 se ha asociado con alto grado histológico y aumento de los niveles de marcadores de la proliferación en los tumores mamarios (Caldon *et al*, 2010;Colozza *et al*, 2005). Esto lo observamos en nuestros resultados donde la baja expresión y la negatividad para p27 se asociaron a los tumores GIII, así como a las afectaciones ganglionares N3 (Tabla 27). No encontramos diferencias significativas con los niveles de Ki67, pero si observamos correlación de los altos niveles de p53 con la negatividad

de p27 (Tabla 48), dato que apoya que la ausencia de p27 se asocia con marcadores de peor comportamiento biológico.

Respecto al tamaño tumoral encontramos que los tumores de menor tamaño se asociaron a las altas expresiones de p27. Sorprendentemente, la mayoría de los tumores T3 (9 de 13 casos) presentaron también alta expresión de p27, pero en esta ocasión la expresión fue citoplasmática (Tabla 22). Esto puede ser debido a que eran tumores RE+ y con expresión de CCND1, por lo que probablemente se produzca un secuestro citoplasmático de p27, inhibiendo su acción.

Estudios *in vitro* han demostrado que la acción del antiHER2 se realiza sobre las células HER2+ induciendo el arresto del ciclo mediante la inhibición de la acción de p27. La mayoría de los casos con *HER2* amplificado fueron p27 negativo o mostraron baja expresión (Tabla 41), lo que sugiere que p27 es un regulador de la proliferación en los tumores con amplificaciones de *HER2*.

Varios estudios de CM han demostrado que los niveles bajos o pérdida de expresión de p27 predicen de manera significativa una peor supervivencia, lo que se relaciona con la progresión del tumor y el pronóstico. Esos estudios demostraron que en determinados subgrupos de pacientes con CM, la reducción de la expresión de p27 identificaba a las pacientes con un peor pronóstico independientemente de otros marcadores. En nuestro estudio de SLE observamos una tendencia sin llegar a ser significativa ($p=0.054$), del grupo con pérdida de p27 a tener menores porcentajes de SLE a 96 meses, comparado con los grupos con bajas y altas expresiones de p27 (45.9% vs 54.5% y 63.8% respectivamente) (Figura 41). Estas observaciones apoyan que la pérdida de p27 puede tener valor como marcador de pronóstico adverso, al menos en los tumores de mama de nuestra serie. Se necesitan estudios con un mayor número de casos para su confirmación. En la SG no hallamos diferencias significativas.

5.2.11. FOXA1

FOXA1 es un factor de transcripción esencial en la regulación de la actividad de la vía de señalización de RE, mejorando la exposición de los sitios de unión del RE a sus genes diana hasta en un 50% (Ademuyiwa *et al*, 2010; Hurtado *et al*, 2011; Robinson

et al, 2013;Wolf *et al*, 2007). La expresión de FOXA1 tiene una fuerte asociación con la expresión de RE en el CM, siendo un marcador esencial de los tumores del subtipo Luminal (Ademuyiwa *et al*, 2010;Bernardo *et al*, 2010;Cancer Genome Atlas Network, 2012;Mehta *et al*, 2012;Perou *et al*, 2000;Wolf *et al*, 2007). No obstante, la expresión de FOXA1 también se ha observado en un subgrupo de tumores RE negativos, lo que demuestra que FOXA1 regula otras vías de señalización independientes de RE en el CM (Albergaria *et al*, 2009;Wolf *et al*, 2007).

La expresión de FOXA1 en nuestro estudio fue predominantemente positiva con 60.9% de casos positivos altos, 12.8% positivos intermedios y 5.6% con baja expresión de FOXA1 (menos de 10% de las células). La ausencia de expresión se observó hasta en un 20% de los tumores de la serie (Tabla 20). En línea con lo descrito previamente, encontramos una fuerte asociación directa ($p<0.001$) con los receptores hormonales nucleares (RE, RP y RA – ver tablas 46 y 63) y con los subtipos Luminal A y B (Tabla 34). La correlación de FOXA1 con los otros marcadores asociados a la vía de señalización de RE también fue significativa, asociándose su alta expresión con las altas expresiones de GATA3, CCND1, Bcl2 y p27 (Tablas 44, 55, 61 y 62).

En los tumores RE negativos observamos que el subtipo Triple Negativo se correlacionaba con la negatividad para FOXA1. Respecto al subtipo HER2 Sobreexpresado, cabe destacar que la mayoría de los casos mostraban expresión de FOXA1 (77%). La expresión de FOXA1 en tumores con alteraciones en la vía de señalización HER2 ha sido descrita recientemente (Mehta *et al*, 2012;Naderi *et al*, 2012;Sircoulomb *et al*, 2010;Yamaguchi *et al*, 2008). Naderi *et al* estudiaron la interacción entre FOXA1 y la señalización de HER2 en los tumores RE negativos, demostrando que existe una regulación bilateral entre estos genes; por un lado *CREB1* y *c-fos* (genes conocidos de la vía HER2) regulan la transcripción de FOXA1, y por otro lado AP2 α regula la expresión de FOXA1 y de HER2. Este perfil de expresión RE-/FOXA1+/HER2+ se asocia así mismo con tumores RA+ y se clasifican hoy en día en el subtipo Apocrino Molecular (Farmer *et al*, 2005;Naderi *et al*, 2012). La biología y el papel de FOXA1 en los tumores RE negativos no está completamente establecida por lo que sigue siendo tema de interés en los estudios de CM.

Debido al gran impacto provocado por los estudios de expresión génica en los tumores mamarios, se han realizado múltiples trabajos buscando el valor pronóstico o predictivo de los genes implícitos en cada una de las firmas moleculares de los subtipos de CM y su expresión IHQ. Uno de estos ha sido FOXA1, el cual se ha implicado en la diferenciación celular de la mama y como inhibidor del crecimiento tumoral en líneas celulares (Badve *et al*, 2011; Bernardo *et al*, 2010; Wolf *et al*, 2007). Es reseñable que en nuestro estudio encontramos asociación de los grados histológicos bajos con la alta expresión de FOXA1 (Tabla 25), lo que apoya la teoría de la mejor diferenciación en los CM hormonodependientes que coexpresan FOXA1 (Badve *et al*, 2011). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la correlación con el tamaño tumoral, la afectación ganglionar ni en el estudio de supervivencia. La expresión de FOXA1 se asociaba inversamente con la expresión de p53 y p16 (Tablas 47 y 50), ambas proteínas supresoras de tumores conocidas como factores adversos del CM cuando se encuentran sobreexpresadas.

5.2.12. GATA3

GATA3 es una proteína altamente conservada que juega un papel esencial en el desarrollo y la diferenciación de la glándula mamaria y en la diferenciación luminal. Dentro de los diferentes estudios de expresión génica realizados sobre CM, GATA3 ha demostrado ser un buen marcador de supervivencia en esta enfermedad y diferentes estudios lo han confirmado mediante IHQ (Hoch *et al*, 1999; Jacquemier *et al*, 2005; Mehra *et al*, 2005). En nuestra serie la mayoría de los casos (92.7%) fueron GATA3 positivos, y un elevado porcentaje de ellos (74.3%) mostraban alta expresión de la proteína. En concordancia con lo previamente descrito (Mehra *et al*, 2005; Voduc *et al*, 2008) encontramos una fuerte asociación entre la expresión de GATA3 y RE, encontrando que hasta un 97% de casos GATA3 positivos expresan RE, esto es debido a que GATA3 y RE se regulan mutuamente y cada uno de los factores es necesario para la transcripción del otro (Eeckhoute *et al*, 2007). En el análisis de los datos clínicos observamos que la alta expresión de GATA3 se asoció a ausencia o baja afectación ganglionar, resultado similar al encontrado por Mehra *et al* (Mehra *et al*, 2005). No encontramos asociación entre la expresión de GATA3 y tamaño tumoral o grado.

La expresión de GATA3 se correlacionó con alta expresión de CCND1, Bcl2 y FOXA1 (Tablas 44, 61 y 62), todos ellos marcadores ligados a la ruta de señalización de RE. La asociación entre las expresiones de GATA3 y CCND1 ha sido recientemente descrita por Shan L *et al* (Shan *et al*, 2013), quien confirma que GATA3 promueve la proliferación celular y la tumorigénesis facilitando la transición de la fase G1/S a través de CCND1 en células de CM.

Como era esperable por su papel en la diferenciación luminal de la mama, los subtipos luminales (tanto A como B) expresaban altos niveles de GATA3 en más del 90% de los casos (Tabla 34). Respecto a la expresión de GATA3 en tumores RE negativos, los trabajos publicados presentan unas frecuencias muy variables (desde un 5% hasta un 50%), posiblemente por los diferentes umbrales utilizados en ellos. En nuestro trabajo, a pesar de ser los subtipos HER2 y Triple Negativo los de menor expresión de GATA3, encontramos un porcentaje bastante elevado, un 77% de los HER2 y un 83% de los Triple Negativos son positivos para GATA3. Se ha descrito que GATA3 puede ser un marcador útil en el CM metastático, especialmente en los tumores RE negativos (Bernardo *et al*, 2010; Cimino-Mathews *et al*, 2013; Liu *et al*, 2012), ya que es un marcador muy específico de linaje mamario, siendo por tanto de gran ayuda para la filiación de los carcinomas de origen desconocido. La alta positividad en nuestra serie confirma este punto.

GATA3 se ha descrito como un factor independiente asociado al comportamiento clínico, de modo que su baja expresión confiere mal pronóstico (Bertucci *et al*, 2000; Farmer *et al*, 2005; Hoch *et al*, 1999; Mehra *et al*, 2005; Sotiriou *et al*, 2003; van 't Veer *et al*, 2002; Wang *et al*, 2005). Las últimas publicaciones (Ciocca *et al*, 2009; Voduc *et al*, 2008) plantean la cuestión de que su valor pronóstico no es independiente de RE. Nosotros hemos encontrado una asociación de GATA3 con la SLE, encontrando unas tasas de SLE a 60 meses de un 79.4% en el grupo de alta expresión de GATA3, mientras que los tumores negativos para GATA3 obtuvieron una menor SLE, con una tasa del 61.5% (Figura 40). La expresión de GATA3 en el CIM se ha correlacionado con respuesta a la terapia hormonal y ausencia de respuesta a citotóxicos (Cimino-Mathews *et al*, 2013), por lo que algunos autores sugieren que conocer el estado de GATA3 por IHQ puede ayudar a elegir la mejor opción terapéutica en el grupo de pacientes RE positivos y GATA3 negativos.

5.2.13. AURKA/STK15

AURKA/STK15 juega un papel esencial en la segregación cromosómica y se ha descrito su implicación en la formación y progresión de diferentes tipos tumorales (Bischoff *et al*, 1998; Katayama *et al*, 2003; Meraldi *et al*, 2004; Sen *et al*, 1997) incluyendo el CM. En nuestro estudio un 18% de los CM fue positivo para este marcador (Tabla 20). Existen pocos estudios que analicen la expresión de AURKA por IHQ y con resultados muy dispares, posiblemente por ser series con un bajo número de casos y por los diferentes anticuerpos utilizados, así como los puntos de corte empleados. Nuestros resultados se aproximan a los encontrados por Royce *et al*, quien en un estudio de 112 casos encontró un 26% de casos positivos (Royce *et al*, 2004).

Debido a la función de AURKA, sería esperable encontrar una asociación entre los altos niveles y tumores clínicamente más agresivos como describió Miyoshi *et al* (Miyoshi *et al*, 2001). Sin embargo, este resultado no ha sido confirmado en estudios posteriores e incluso se ha descrito la asociación contraria (grado con mayor diferenciación y altas expresiones). Poniendo como punto de corte de positividad el 20% de las células teñidas (umbral utilizado por Royce *et al* (Royce *et al*, 2004)), encontramos una fuerte asociación ($p < 0.001$) entre la expresión de la quinasa y aquellos tumores de alto grado. En nuestro trabajo no encontramos relación entre la expresión de AURKA y el tamaño tumoral ni la afectación ganglionar.

La expresión de AURKA ha sido propuesta por algunos autores (Ali *et al*, 2012) como un marcador de proliferación, esto explica que la mayoría de nuestros casos AURKA positivos muestren alta expresión de Ki67 (Tabla 49). En un estudio más reciente (Siggelkow *et al*, 2012) se postula que AURKA se comporta de manera diferente en los casos RE+HER2-, en los que actúa como factor de mal pronóstico frente a aquellos RE-HER2-, o los HER2+, en los que no se ha encontrado asociación con el pronóstico. El hecho de que AURKA pueda actuar de manera diferente en los distintos subtipos tumorales explica los resultados contradictorios expuestos anteriormente. En nuestro trabajo hemos encontrado que la mayoría de los casos AURKA positivos pertenecían a los grupos Luminal B y Triple Negativo. Por otro lado, la expresión de AURKA en el subtipo Luminal A fue muy infrecuente (4 casos de

68), pero curiosamente esta expresión en los casos Luminales A positivos para AURKA fue intensa, observándose en más del 50% de las células, no tenemos una explicación para este hallazgo (Tabla 36).

AURKA interacciona a distintos niveles con la ruta de señalización de p53: 1) produce la fosforilación de p53 en Ser315 facilitando la degradación de p53 mediada por MDM2 (Katayama *et al*, 2004), y 2) fosforila p53 en Ser215 inactivando su actividad transcripcional (Liu *et al*, 2004). Por otro lado p53 interactúa con AURKA para suprimir su actividad oncogénica (Chen *et al*, 2002). Cualquier alteración en este equilibrio AURKA/p53 conducirá a una inestabilidad cromosómica y carcinogénesis (Mao *et al*, 2007). De manera similar a lo descrito por Mao *et al* en líneas celulares y tumores de CM, en nuestro estudio hemos encontrado asociación entre la expresión positiva de AURKA y la expresión positiva de p53 (Tabla 49), dato que apoyaría el argumento de esos autores que sugieren que en las células neoplásicas se produce una disrupción del *feed-back* entre p53 y AURKA.

5.2.14. GCDFP-15

La glucoproteína GCDFP-15 se considera un marcador de diferenciación apocrina y su expresión es una característica de los carcinomas apocrinos, sin embargo también se encuentra en menor proporción en tumores no apocrinos. La frecuencia de expresión de GCDFP-15 en CM varía entre un 23% y un 85% según la serie estudiada (Bhargava *et al*, 2007;Fritzsche *et al*, 2007;Han *et al*, 2003;Huo *et al*, 2013;Lewis *et al*, 2011;Park *et al*, 2007;Wick *et al*, 1989). En nuestro estudio encontramos frecuencias bajas de expresión de GCDFP-15, con un 22% de casos positivos (Tabla 20), frecuencia similar a la publicada por Mazoujian (Mazoujian *et al*, 1989). Esta diferencia en la frecuencia puede ser debido a los diferentes anticuerpos utilizados, el tamaño del cilindro, o diferencias entre las series. GCDFP-15 es un marcador muy específico de tejido mamario (Park *et al*, 2007), pero poco sensible.

La mayoría de los CM similar a las células basales son GCDFP-15 negativos (Luo *et al*, 2013) por lo que su inclusión en paneles de anticuerpos para la filiación de metástasis de origen desconocido es un tema de debate, y un resultado negativo debe ser interpretado con precaución. En nuestras manos y por lo expuesto anteriormente

GATA3 es un marcador de linaje más específico y con mayor utilidad en el CM metastático.

Recientemente se ha publicado (Villaroel *et al*, 2012, Luo *et al*, 2013) una asociación entre mayor grado histológico y menor expresión de GCDFP-15, resultados similares a los encontrados en nuestra serie donde a medida que aumenta el grado va disminuyendo GCDFP-15 (Tabla 26). Otros autores (Mazoujian *et al*, 1989) no encontraron asociación entre la positividad para la GCDFP-15 y el grado histológico.

La síntesis y secreción de GCDFP-15 está regulada por los andrógenos (Haagensen *et al*, 1992; Miller *et al*, 1988), y Honma *et al* mostró en el año 2005 que la expresión de GCDFP-15 se correlaciona de manera positiva con la expresión de RA (Honma *et al*, 2005). Esto concuerda con nuestros resultados (Tabla 58), donde encontramos una asociación directa significativa entre la expresión de ambos marcadores.

5.2.15. GDF15

El aumento de los niveles circulantes de GDF15 en suero se ha asociado clínicamente con progresión tumoral y con resistencia al tratamiento quimioterápico en diferentes tipos de tumores (mama, próstata, ovario y colorectal) (Mimeault *et al*, 2013). En el CM, mediante la fosforilación de HER2, GDF15 reduce la sensibilidad de las células HER2 positivas al trastuzumab, pudiendo ser un potencial marcador biológico predictivo de respuesta al trastuzumab (Joshi *et al*, 2011).

Existen pocos trabajos que evalúen la expresión IHQ de GDF15 en tumores de mama ya que la mayoría están realizados en suero de pacientes o sobre líneas celulares, sin que se conozca que porcentaje de casos presentan sobreexpresión de la proteína en tejido. En nuestro estudio encontramos que GDF15 se expresaba en un 25% de los casos y esta expresión estaba aumentada en los casos positivos para la expresión de HER2, de manera similar a lo descrito en líneas celulares por Joshi *et al*. Dentro del grupo positivo para GDF15 encontramos que un 20% de los casos resultó positivo para HER2 (Tabla 58), siendo éste el subgrupo susceptible de presentar resistencia al trastuzumab. Intentamos averiguar si dentro de los casos HER2 positivos la expresión de GDF15

confería mejor o peor pronóstico, pero el número de casos es pequeño para realizar un estudio de supervivencia. Lo que sí observamos fue que la mayoría de los casos HER2+/GDF15+ pertenecían al subgrupo Luminal B.

La expresión de HER2 en el CM confiere mal pronóstico y la resistencia primaria o adquirida al trastuzumab es frecuente, por lo que el desarrollo de fármacos con la finalidad de inhibir a GDF15 y revertir de ese modo la resistencia a trastuzumab abre un campo de investigación de gran interés.

Un resultado interesante es la asociación que hemos encontrado entre la expresión de GDF15 y una SG acortada (Figura 38), no sabemos si estos pacientes presentaron resistencia al tratamiento.

5.2.16. Proteína p63

La proteína p63 pertenece a la familia de p53 y participa en la supresión tumoral y en la apoptosis. Normalmente, p63 se expresa en las células basales de la próstata y células mioepiteliales de la mama, lo que permite el diagnóstico diferencial de las lesiones benignas y el carcinoma invasivo, ya que la pérdida de células basales o mioepiteliales caracteriza a los tumores invasivos. p63 también se expresa en las células neoplásicas de los carcinomas de células escamosas y transicionales.

La expresión de p63 es característica de los carcinomas metaplásicos mamarios. En nuestra serie en la que no hay ningún carcinoma de tipo metaplásico, hemos encontrado un 8,4% de casos de CIM con expresión nuclear (focal y en células aisladas) de p63 (Tabla 20). La sobreexpresión de p63 se asoció en nuestra serie con negatividad para RP, alta expresión de FOXA1 (Tabla 56) y aunque la correlación no fue significativa, si evidenciamos una tendencia estadística entre la expresión de p63 en las células neoplásicas y altos niveles de Ki67.

Hay muy pocos datos en la literatura acerca de la expresión de p63 en los CIM no metaplásicos. En un trabajo reciente de Reigosa *et al* (Reigosa *et al*, 2010) encuentran un 12% de casos p63 positivos (24 de 200 muestras), siendo la mayoría de

ellos del subtipo Triple Negativo. En nuestra serie los casos con expresión de p63 se agrupan fundamentalmente dentro del subtipo HER2 Sobreexpresado (Tabla 34). Koker & Kleer (Koker & Kleer, 2004) en una serie de 189 CIM, sólo encuentran un caso p63 positivo no metaplásico y subrayan que se trata de un CM de alto grado histológico. Para confirmar que la expresión de p63 se correlaciona con altos índices de proliferación y por lo tanto con CIM de alto grado histológico sería necesario el estudio de este marcador en series amplias de CIM.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En nuestra serie, las variables clásicas, grado I, tamaño tumoral T1 y la ausencia o baja afectación ganglionar se asociaron a una mejor supervivencia.

2. La clasificación en subtipos tumorales mediante parámetros inmunohistoquímicos nos permite diferenciar neoplasias con diferente comportamiento biológico, agresividad y supervivencia.

- Los subtipos HER2 sobreexpresado y Triple Negativo presentaron una peor supervivencia global.
- La mayor supervivencia correspondió al subtipo Luminal A.
- La expresión de RE y RP se asoció a bajo grado nuclear y ausencia o baja afectación ganglionar

3. La expresión del antígeno Ki67, marcador de proliferación celular, se asocia con mayor grado histológico.

4. Los altos índices de Ki67 se asociaron a marcadores de mal pronóstico: HER2, p53, p16, y Rb.

5. En nuestra serie encontramos una estrecha correlación entre la expresión alta de HER2 y la presencia de amplificación del gen, este dato apoya la utilidad de la metodología actual (IHC y FISH restringido) para seleccionar a este grupo de pacientes.

6. Los tumores HER2 son neoplasias altamente proliferativas. En nuestra serie encontramos asociación con:

- Alto grado histológico
- Alto índice de proliferación (Ki67)
- Alteraciones de las proteínas del ciclo celular consistentes en:
 - Ausencia de expresión de p27
 - Ausencia de expresión de p21

- Sobreexpresión de Rb

7. La expresión CCND1 se asocia estrechamente con la expresión de RE en los CIM, es decir de los cánceres mamarios de tipo luminal. Dentro de este grupo se observa que:

- Las expresiones bajas se asocian a factores pronósticos favorables (GI y GII y N bajos).
- Por el contrario las altas expresiones de CCND1 se asocian a alto índice de proliferación. Los CIM de tipo RE+ con alta expresión de CCND1 podrían ser un grupo de mal pronóstico dentro de este subtipo de CM.

8. La amplificación génica alta de *CCND1* se asocia a una menor SLE por lo que en nuestra serie se comporta como un factor de mal pronóstico.

9. La alta expresión de p53 se observa en los CM del subtipo Luminal B y Triple Negativo.

10. En nuestra serie la expresión de p53 no se asocia a supervivencia aunque se relaciona con factores pronósticos desfavorables como alta proliferación y sobreexpresión de Rb.

11. Las valoraciones negativas de Rb se asocian al subtipo Triple Negativo y Luminal A.

12. La expresión de la proteína p16 se asocia a una menor diferenciación celular en todos los subtipos tumorales de CIM, asociándose especialmente al grupo Triple Negativo.

13. El grupo Triple Negativo muestra un perfil de expresión caracterizado por ser Rb negativos con alta de p16 y sobreexpresión de p53.

14. La expresión de la proteína p16 tiene un papel pronóstico en el CIM. Su alta expresión se asocia a factores de riesgo adversos (sobreexpresión de p53 y alta proliferación) y conlleva una menor SG.

15. La alta expresión de p21 se asocia con un alto índice de proliferación, especialmente en el grupo de tumores RE+. Este dato sugiere que la alta expresión de p21 podría ser un marcador de pronóstico adverso en los CM RE+.

16. La pérdida de expresión de p27 se asocia con tumores de alto grado y afectación ganglionar N3, indicando que podría tratarse de un marcador pronóstico adverso. En nuestro estudio de SLE observamos que los casos con pérdida de p27 mostraban una tendencia ($p=0.054$) a tener peor SLE.

17. FOXA1 se asocia estrechamente la expresión de receptores hormonales, es por lo tanto un marcador del CM de tipo luminal. Se expresa en un grupo de tumores HER2+ y es sistemáticamente negativo en el grupo Triple Negativo.

18. La alta expresión de FOXA1 se asocia con bajo grado histológico dato que apoya que FOXA1 es un factor de diferenciación en los tumores mamarios.

19. GATA3 se asocia fuertemente a la expresión de receptores hormonales reflejando su papel regulador en la transcripción de dichos receptores.

20. GATA3 también se expresa en los tumores no luminales, en este dato se basa su papel como marcador útil en el CM metastático.

21. La alta expresión de GATA3 es un factor pronóstico favorable en el CIM. Se correlaciona clínicamente con la ausencia o baja afectación ganglionar y se asocia a mejor SLE.

22. AURKA es un marcador de proliferación que en nuestra serie se asocia a los CIM del tipo Luminal B y Triple Negativo, ambos caracterizados por tener altos índices de proliferación.

23. La expresión de AURKA y la expresión de p53 están asociadas en el CIM, lo que sugiere que en los CM asociados a alteración de p53 se pierde el control de AURKA.

24. La expresión de GCDFP-15 en los CM de nuestra serie se asocia con la expresión de RA, apoyando su papel como marcador de diferenciación apocrina.

25. La baja incidencia de expresión de GCDFP-15 encontrada en nuestro estudio no apoya su utilización como marcador de linaje mamario.

26. La expresión de GDF15 es un factor de mal pronóstico en nuestra serie, asociándose a menor supervivencia global.

7. LISTADO DE ABREVIATURAS

7. LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AO	Angela B. Ortiz
ASCO	Sociedad Americana de Oncología Clínica
AURKA	Aurora Kinasa A
BAG	Biopsia con aguja gruesa
Bcl2	Proteína del linfoma de células B – 2
BSGC	Biopsia selectiva del ganglio centinela
CAP	Colegio Americano de Patólogos
CB	Carmen Bellas
CCND1	Ciclina D1
CDI	Carcinoma ductal infiltrante
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CDK	Cinasa dependiente de ciclinas
CIM	Carcinoma Infiltrante de Mama
CK	Citoqueratina
CLI	Carcinoma lobulillar infiltrante
CM	Carcinoma de Mama
DBD	Dominio de unión al ADN
DHT	Dihidrotestosterona
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
FISH	Hibridación in situ fluorescente
FOXA1	Factor de transcripción Forkhead box protein A1
GATA3	Factor de transcripción GATA3
GDF15	Factor de crecimiento/diferenciación 15
GCDFP-15	Glicoproteína del fluido de los quistes de la enfermedad fibroquística
HE	Hematoxilina-Eosina
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo II
HRG	Hergulinas
HSP	Proteínas de choque térmico
IHQ	Inmunohistoquímica
ITC	Agrupaciones de células tumorales aisladas
is	<i>in situ</i>

LDB	Dominio de unión al ligando
M	Metástasis a distancia
MAPK	MAP cinasa
mi	Micrometástasis
MIC-1	Citocina inhibidora de macrófagos
N	Afectación ganglionar
NST	Tipo no especial
NTD	Dominio transcripcional
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAAF	Punción aspiración con aguja fina
PIP	Proteína inducida por la prolactina
PI3K	Cinasa Fosfatidilinositol 3
PM	Paloma Martín
PTGF-β	Factor de crecimiento transformante placentario beta
RA	Receptor de andrógenos
Rb	Proteína retinoblastoma
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SG	Supervivencia global
SHBG	Globulina de unión a hormonas sexuales
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
T	Tumoración/Tamaño tumoral
TF	Factor de transcripción
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TK	Tirosina cinasa
TMA	Matrices de tejido
TNM	Sistema de estadificación de tumores según: el tumor (T), los nódulos (N) y las metástasis (M).

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Fatah,T.M., Perry,C., Dickinson,P., Ball,G., Moseley,P., Madhusudan,S., Ellis,I.O., & Chan,S.Y. (2013) Bcl2 is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings. *Ann.Oncol.*, **24**, 2801-2807.
- Ademuyiwa,F.O., Thorat,M.A., Jain,R.K., Nakshatri,H., & Badve,S. (2010) Expression of Forkhead-box protein A1, a marker of luminal A type breast cancer, parallels low Oncotype DX 21-gene recurrence scores. *Mod.Pathol.*, **23**, 270-275.
- Al,S.S., Sharaf,L.H., & Luqmani,Y.A. (2011) Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review). *Int.J.Oncol*, **38**, 1197-1217.
- Al-Khalaf,H.H. & Aboussekhra,A. (2013) p16(INK4A) positively regulates p21(WAF1) expression by suppressing AUF1-dependent mRNA decay. *PLoS.One.*, **8**, e70133.
- Albergaria,A., Paredes,J., Sousa,B., Milanezi,F., Carneiro,V., Bastos,J., Costa,S., Vieira,D., Lopes,N., Lam,E.W., Lunet,N., & Schmitt,F. (2009) Expression of FOXA1 and GATA-3 in breast cancer: the prognostic significance in hormone receptor-negative tumours. *Breast Cancer Res.*, **11**, R40.
- Ali,H.R., Dawson,S.J., Blows,F.M., Provenzano,E., Pharoah,P.D., & Caldas,C. (2012) Aurora kinase A outperforms Ki67 as a prognostic marker in ER-positive breast cancer. *Br.J.Cancer*, **106**, 1798-1806.
- Alvarenga,C.A., Paravidino,P.I., Alvarenga,M., Gomes,M., Dufloth,R., Zeferino,L.C., Vassallo,J., & Schmitt,F.C. (2012) Reappraisal of immunohistochemical profiling of special histological types of breast carcinomas: a study of 121 cases of eight different subtypes. *J.Clin.Pathol.*, **65**, 1066-1071.
- Anderson,T.J., Alexander,F.E., Lamb,J., Smith,A., & Forrest,A.P. (2000) Pathology characteristics that optimize outcome prediction of a breast screening trial. *Br.J.Cancer*, **83**, 487-492.
- Badve,S., Dabbs,D.J., Schnitt,S.J., Baehner,F.L., Decker,T., Eusebi,V., Fox,S.B., Ichihara,S., Jacquemier,J., Lakhani,S.R., Palacios,J., Rakha,E.A., Richardson,A.L., Schmitt,F.C., Tan,P.H., Tse,G.M., Weigelt,B., Ellis,I.O., & Reis-Filho,J.S. (2011) Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod.Pathol.*, **24**, 157-167.
- Badve,S. & Nakshatri,H. (2009) Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications. *J.Clin.Pathol.*, **62**, 6-12.
- Barbareschi,M., Caffo,O., Doglioni,C., Fina,P., Marchetti,A., Buttitta,F., Leek,R., Morelli,L., Leonardi,E., Bevilacqua,G., Dalla,P.P., & Harris,A.L. (1996) p21WAF1 immunohistochemical expression in breast carcinoma: correlations

- with clinicopathological data, oestrogen receptor status, MIB1 expression, p53 gene and protein alterations and relapse-free survival. *Br.J.Cancer*, **74**, 208-215.
- Bernardo,G.M., Lozada,K.L., Miedler,J.D., Harburg,G., Hewitt,S.C., Mosley,J.D., Godwin,A.K., Korach,K.S., Visvader,J.E., Kaestner,K.H., Abdul-Karim,F.W., Montano,M.M., & Keri,R.A. (2010) FOXA1 is an essential determinant of ERalpha expression and mammary ductal morphogenesis. *Development*, **137**, 2045-2054.
- Bertheau,P., Lehmann-Che,J., Varna,M., Dumay,A., Poirot,B., Porcher,R., Turpin,E., Plassa,L.F., de,R.A., Boustyn,E., de,C.P., Janin,A., Giacchetti,S., Espie,M., & de,T.H. (2013) p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast*, **22 Suppl 2**, S27-S29.
- Bertucci,F.; Houlgatte,R.; Benziene,A.; Granjeaud,S.; Adelaide,J.; Tagett,R.; Lorigod,B.; Jacquemier,J.; Viens,P.; Jordan,B.; Birnbaum,D.; Nguyen,C. (2000) Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum.Mol.Genet*, **9**, 2981-2991.
- Bhargava,R., Beriwal,S., & Dabbs,D.J. (2007) Mammaglobin vs GCDFP-15: an immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. *Am.J.Clin.Pathol.*, **127**, 103-113.
- Bhargava,V., Kell,D.L., van de Rijn,M., & Warnke,R.A. (1994) Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. *Am.J.Pathol.*, **145**, 535-540.
- Biankin,A.V., Biankin,S.A., Kench,J.G., Morey,A.L., Lee,C.S., Head,D.R., Eckstein,R.P., Hugh,T.B., Henshall,S.M., & Sutherland,R.L. (2002) Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. *Gut*, **50**, 861-868.
- Bischoff,J.R., Anderson,L., Zhu,Y., Mossie,K., Ng,L., Souza,B., Schryver,B., Flanagan,P., Clairvoyant,F., Ginther,C., Chan,C.S., Novotny,M., Slamon,D.J., & Plowman,G.D. (1998) A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.*, **17**, 3052-3065.
- Bohn,O.L., Fuertes-Camilo,M., Navarro,L., Saldivar,J., & Sanchez-Sosa,S. (2010) p16INK4a expression in basal-like breast carcinoma. *Int.J.Clin Exp.Pathol.*, **3**, 600-607.
- Bosetti,C., Bertuccio,P., Malvezzi,M., Levi,F., Chatenoud,L., Negri,E., & La,V.C. (2013) Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980. *Ann.Oncol.*, **24**, 2657-2671.
- Bottner,M., Laaff,M., Schechinger,B., Rappold,G., Unsicker,K., & Suter-Crazzolara,C. (1999) Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene*, **237**, 105-111.

- Bozza,C., Osa,E.O., & Puglisi,F. (2013) Primary therapy in breast cancer: what have we learned from landmark trials? *Womens Health (Lond Engl.)*, **9**, 583-593.
- Caldon,C.E., Daly,R.J., Sutherland,R.L., & Musgrove,E.A. (2006) Cell cycle control in breast cancer cells. *J.Cell Biochem.*, **97**, 261-274.
- Caldon,C.E., Sutherland,R.L., & Musgrove,E. (2010) Cell cycle proteins in epithelial cell differentiation: implications for breast cancer. *Cell Cycle*, **9**, 1918-1928.
- Callagy,G., Cattaneo,E., Daigo,Y., Happerfield,L., Bobrow,L.G., Pharoah,P.D., & Caldas,C. (2003) Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn.Mol.Pathol.*, **12**, 27-34.
- Callagy,G.M., Webber,M.J., Pharoah,P.D., & Caldas,C. (2008) Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC.Cancer*, **8**, 153.
- Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **490**, 61-70.
- Chacon,R.D. & Costanzo,M.V. (2010) Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **12 Suppl 2**, S3.
- Charpin,C., Andrac,L., Vacheret,H., Habib,M.C., Devictor,B., Lavaut,M.N., & Toga,M. (1988) Multiparametric evaluation (SAMBA) of growth fraction (monoclonal Ki67) in breast carcinoma tissue sections. *Cancer Res.*, **48**, 4368-4374.
- Cheang,M.C., Chia,S.K., Voduc,D., Gao,D., Leung,S., Snider,J., Watson,M., Davies,S., Bernard,P.S., Parker,J.S., Perou,C.M., Ellis,M.J., & Nielsen,T.O. (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.*, **101**, 736-750.
- Chen,S.S., Chang,P.C., Cheng,Y.W., Tang,F.M., & Lin,Y.S. (2002) Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *EMBO J.*, **21**, 4491-4499.
- Cho,E.Y., Choi,Y.L., Han,J.J., Kim,K.M., & Oh,Y.L. (2008a) Expression and amplification of Her2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer: immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Pathol.Int.*, **58**, 17-25.
- Cho,E.Y., Han,J.J., Choi,Y.L., Kim,K.M., & Oh,Y.L. (2008b) Comparison of Her-2, EGFR and cyclin D1 in primary breast cancer and paired metastatic lymph nodes: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *J.Korean Med.Sci.*, **23**, 1053-1061.
- Choi,E.J., Yun,J.A., Jeon,E.K., Won,H.S., Ko,Y.H., & Kim,S.Y. (2013) Prognostic significance of RSP01, WNT1, P16, WT1, and SDC1 expressions in invasive ductal carcinoma of the breast. *World J.Surg.Oncol.*, **11**, 314.
- Choritz,H., Busche,G., & Kreipe,H. (2011) Quality assessment of HER2 testing by monitoring of positivity rates. *Virchows Arch.*, **459**, 283-289.

- Cianfrocca,M. & Goldstein,L.J. (2004) Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist.*, **9**, 606-616.
- Cianfrocca,M. & Gradishar,W. (2009) New molecular classifications of breast cancer. *CA Cancer J.Clin.*, **59**, 303-313.
- Cimino-Mathews,A., Subhawong,A.P., Illei,P.B., Sharma,R., Halushka,M.K., Vang,R., Fetting,J.H., Park,B.H., & Argani,P. (2013) GATA3 expression in breast carcinoma: utility in triple-negative, sarcomatoid, and metastatic carcinomas. *Hum.Pathol.*, **44**, 1341-1349.
- Ciocca,V.; Daskalakis,C.; Ciocca,R.M.; Ruiz-Orrico,A.; Palazzo,J.P. (2009) The significance of GATA3 expression in breast cancer: a 10-year follow-up study. *Hum.Pathol.*, **40**, 489-495.
- Collins,L.C., Cole,K.S., Marotti,J.D., Hu,R., Schnitt,S.J., & Tamimi,R.M. (2011) Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod.Pathol.*, **24**, 924-931.
- Colozza,M., Azambuja,E., Cardoso,F., Sotiriou,C., Larsimont,D., & Piccart,M.J. (2005) Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann.Oncol.*, **16**, 1723-1739.
- Dabbs,D.J., Schnitt,S.J., Geyer,F.C., Weigelt,B., Baehner,F.L., Decker,T., Eusebi,V., Fox,S.B., Ichihara,S., Lakhani,S.R., Palacios,J., Rakha,E., Richardson,A.L., Schmitt,F.C., Tan,P.H., Tse,G.M., Vincent-Salomon,A., Ellis,I.O., Badve,S., & Reis-Filho,J.S. (2013) Lobular neoplasia of the breast revisited with emphasis on the role of E-cadherin immunohistochemistry. *Am.J.Surg.Pathol.*, **37**, e1-11.
- Dávalos-Salas,M. & Recillas-Targa,F. (2011) La vía Rb/E2F y la familia de proteínas represoras polycomb en el desarrollo del cáncer. *Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol.*, **14**, 38-50.
- de,A.E., Cardoso,F., de,C.G., Jr., Colozza,M., Mano,M.S., Durbecq,V., Sotiriou,C., Larsimont,D., Piccart-Gebhart,M.J., & Paesmans,M. (2007) Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br.J.Cancer*, **96**, 1504-1513.
- Desmedt,C., Voet,T., Sotiriou,C., & Campbell,P.J. (2012) Next-generation sequencing in breast cancer: first take home messages. *Curr.Opin.Oncol.*, **24**, 597-604.
- Dowsett,M., Procter,M., McCaskill-Stevens,W., de,A.E., Dafni,U., Rueschoff,J., Jordan,B., Dolci,S., Abramovitz,M., Stoss,O., Viale,G., Gelber,R.D., Piccart-Gebhart,M., & Leyland-Jones,B. (2009) Disease-free survival according to degree of HER2 amplification for patients treated with adjuvant chemotherapy with or without 1 year of trastuzumab: the HERA Trial. *J.Clin.Oncol*, **27**, 2962-2969.
- Dressler,A.C., Hudelist,G., Fink-Retter,A., Gschwantler-Kaulich,D., Pfeiler,G., Rosner,M., Hengstschlager,M., & Singer,C.F. (2013) Tuberin and p27 expression in breast cancer patients with or without BRCA germline mutations. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, **139**, 1349-1355.

- Duchnowska,R., Dziadziuszko,R., Czartoryska-Arlukowicz,B., Radecka,B., Szostakiewicz,B., Sosinska-Mielcarek,K., Karpinska,A., Staroslawska,E., Kubiowski,T., & Szczyluk,C. (2009) Risk factors for brain relapse in HER2-positive metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.Treat.*, **117**, 297-303.
- Dumay,A., Feugeas,J.P., Wittmer,E., Lehmann-Che,J., Bertheau,P., Espie,M., Plassa,L.F., Cottu,P., Marty,M., Andre,F., Sotiriou,C., Pusztai,L., & de,T.H. (2013) Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *Int.J.Cancer*, **132**, 1227-1231.
- Edge,S.B., Byrd,D.R., Carducci,M.A., Compton,C.C., & eds (2009) *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. edn, Springer.
- Eeckhoutte,J., Keeton,E.K., Lupien,M., Krum,S.A., Carroll,J.S., & Brown,M. (2007) Positive cross-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *Cancer Res.*, **67**, 6477-6483.
- Ellis,P.A., Lonning,P.E., Borresen-Dale,A., Aas,T., Geisler,S., Akslen,L.A., Salter,I., Smith,I.E., & Dowsett,M. (1997) Absence of p21 expression is associated with abnormal p53 in human breast carcinomas. *Br.J.Cancer*, **76**, 480-485.
- Elsawaf,Z., Sinn,H.P., Rom,J., Bermejo,J.L., Schneeweiss,A., & Aulmann,S. (2013) Biological subtypes of triple-negative breast cancer are associated with distinct morphological changes and clinical behaviour. *Breast*, **22**, 986-992.
- Emig,R., Magener,A., Ehemann,V., Meyer,A., Stilgenbauer,F., Volkmann,M., Wallwiener,D., & Sinn,H.P. (1998) Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation. *Br.J.Cancer*, **78**, 1661-1668.
- Engelsen,I.B., Stefansson,I.M., Akslen,L.A., & Salvesen,H.B. (2008) GATA3 expression in estrogen receptor alpha-negative endometrial carcinomas identifies aggressive tumors with high proliferation and poor patient survival. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **199**, 543-547.
- Ertel,A., Dean,J.L., Rui,H., Liu,C., Witkiewicz,A.K., Knudsen,K.E., & Knudsen,E.S. (2010) RB-pathway disruption in breast cancer: differential association with disease subtypes, disease-specific prognosis and therapeutic response. *Cell Cycle*, **9**, 4153-4163.
- Esteva,F.J. & Hortobagyi,G.N. (2004) Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **6**, 109-118.
- Fairlie,W.D., Moore,A.G., Bauskin,A.R., Russell,P.K., Zhang,H.P., & Breit,S.N. (1999) MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J.Leukoc.Biol.*, **65**, 2-5.
- Farmer,P., Bonnefoi,H., Becette,V., Tubiana-Hulin,M., Fumoleau,P., Larsimont,D., Macgrogan,G., Bergh,J., Cameron,D., Goldstein,D., Duss,S., Nicoulaz,A.L., Brisken,C., Fiche,M., Delorenzi,M., & Iggo,R. (2005) Identification of

- molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*, **24**, 4660-4671.
- Feldman,B.J. & Feldman,D. (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat.Rev Cancer*, **1**, 34-45.
- Fritzsche,F.R., Thomas,A., Winzer,K.J., Beyer,B., Dankof,A., Bellach,J., Dahl,E., Dietel,M., & Kristiansen,G. (2007) Co-expression and prognostic value of gross cystic disease fluid protein 15 and mammaglobin in primary breast cancer. *Histol.Histopathol.*, **22**, 1221-1230.
- Frkovic-Grazio,S. & Bracko,M. (2002) Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. *J.Clin.Pathol.*, **55**, 88-92.
- Fu,X., Huang,C., & Schiff,R. (2011) More on FOX News: FOXA1 on the horizon of estrogen receptor function and endocrine response. *Breast Cancer Res.*, **13**, 307.
- Gaglia,P., Bernardi,A., Venesio,T., Caldarola,B., Lauro,D., Cappa,A.P., Calderini,P., & Liscia,D.S. (1993) Cell proliferation of breast cancer evaluated by anti-BrdU and anti-Ki-67 antibodies: its prognostic value on short-term recurrences. *Eur.J.Cancer*, **29A**, 1509-1513.
- Guerra,C. & Camacho I (2000) Las isoformas del receptor de progesterona: función y regulación. *Rev Invest Clin*, **56**, 686-691.
- Gusterson,B.A., Gelber,R.D., Goldhirsch,A., Price,K.N., Save-Soderborgh,J., Anbazhagan,R., Styles,J., Rudenstam,C.M., Golouh,R., Reed,R., & . (1992) Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J.Clin.Oncol.*, **10**, 1049-1056.
- Gutierrez,C. & Schiff,R. (2011) HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch.Pathol.Lab Med.*, **135**, 55-62.
- Haagensen,D.E., Stewart,P., Dilley,W.G., & Wells,S.A. (1992) Secretion of breast gross cystic disease fluid proteins by T47D breast cancer cells in culture--modulation by steroid hormones. *Breast Cancer Res.Treat.*, **23**, 77-86.
- Hammond,M.E., Hayes,D.F., Dowsett,M., Allred,D.C., Hagerty,K.L., Badve,S., Fitzgibbons,P.L., Francis,G., Goldstein,N.S., Hayes,M., Hicks,D.G., Lester,S., Love,R., Mangu,P.B., McShane,L., Miller,K., Osborne,C.K., Paik,S., Perlmutter,J., Rhodes,A., Sasano,H., Schwartz,J.N., Sweep,F.C., Taube,S., Torlakovic,E.E., Valenstein,P., Viale,G., Visscher,D., Wheeler,T., Williams,R.B., Wittliff,J.L., & Wolff,A.C. (2010) American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J.Clin.Oncol.*, **28**, 2784-2795.
- Han,J.G., Jiang,Y.D., Zhang,C.H., Pang,D., Zhang,M., Wang,Y.B., Xue,W.N., & Sun,Q. (2011) Clinicopathologic characteristics and prognosis of young patients with breast cancer. *Breast.*, **20**, 370-372.

- Han,J.H., Kang,Y., Shin,H.C., Kim,H.S., Kang,Y.M., Kim,Y.B., & Oh,S.Y. (2003) Mammaglobin expression in lymph nodes is an important marker of metastatic breast carcinoma. *Arch.Pathol.Lab Med.*, **127**, 1330-1334.
- Han,S., Ahn,S.H., Park,K., Bae,B.N., Kim,K.H., Kim,H.J., Kim,Y.D., & Kim,H.Y. (2001) P16INK4a protein expression is associated with poor survival of the breast cancer patients after CMF chemotherapy. *Breast Cancer Res.Treat.*, **70**, 205-212.
- Harris,L., Fritsche,H., Mennel,R., Norton,L., Ravdin,P., Taube,S., Somerfield,M.R., Hayes,D.F., & Bast,R.C., Jr. (2007) American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J.Clin.Oncol.*, **25**, 5287-5312.
- Heinlein,C.A. & Chang,C. (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol.Endocrinol.*, **16**, 2181-2187.
- Hoang,M.P., Sahin,A.A., Ordonez,N.G., & Sneige,N. (2000) HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am.J.Clin.Pathol.*, **113**, 852-859.
- Hoch,R.V.; Thompson,D.A.; Baker,R.J.; & Weigel,R.J. (1999) GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast cancer. *Int.J.Cancer*, **84**, 122-128.
- Honma,N., Takubo,K., Akiyama,F., Sawabe,M., Arai,T., Younes,M., Kasumi,F., & Sakamoto,G. (2005) Expression of GCDPF-15 and AR decreases in larger or node-positive apocrine carcinomas of the breast. *Histopathology*, **47**, 195-201.
- Hu,X., Stern,H.M., Ge,L., O'Brien,C., Haydu,L., Honchell,C.D., Haverty,P.M., Peters,B.A., Wu,T.D., Amler,L.C., Chant,J., Stokoe,D., Lackner,M.R., & Cavet,G. (2009) Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. *Mol.Cancer Res.*, **7**, 511-522.
- Hu,Z., Fan,C., Oh,D.S., Marron,J.S., He,X., Qaqish,B.F., Livasy,C., Carey,L.A., Reynolds,E., Dressler,L., Nobel,A., Parker,J., Ewend,M.G., Sawyer,L.R., Wu,J., Liu,Y., Nanda,R., Tretiakova,M., Ruiz,O.A., Dreher,D., Palazzo,J.P., Perreard,L., Nelson,E., Mone,M., Hansen,H., Mullins,M., Quackenbush,J.F., Ellis,M.J., Olopade,O.I., Bernard,P.S., & Perou,C.M. (2006) The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC.Genomics*, **7**, 96.
- Huo,L., Zhang,J., Gilcrease,M.Z., Gong,Y., Wu,Y., Zhang,H., Resetskova,E., Hunt,K.K., & Deavers,M.T. (2013) Gross cystic disease fluid protein-15 and mammaglobin A expression determined by immunohistochemistry is of limited utility in triple-negative breast cancer. *Histopathology*, **62**, 267-274.
- Hurtado,A., Holmes,K.A., Ross-Innes,C.S., Schmidt,D., & Carroll,J.S. (2011) FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response. *Nat.Genet.*, **43**, 27-33.

- Jacquemier,J., Charafe-Jauffret,E., Monville,F., Esterni,B., Extra,J.M., Houvenaeghel,G., Xerri,L., Bertucci,F., & Birnbaum,D. (2009) Association of GATA3, P53, Ki67 status and vascular peritumoral invasion are strongly prognostic in luminal breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **11**, R23.
- Jacquemier,J.; Ginestier,C.; Rougemont,J.; Bardou,V.J.; Charafe-Jauffret,E.; Geneix,J.; Adelaide,J.; Koki,A.; Houvenaeghel,G.; Hassoun,J.; Maraninchi,D.; Viens,P.; Birnbaum,D.; & Bertucci,F. (2005) Protein expression profiling identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis. *Cancer Res.*, **65**, 767-779.
- Jiang,Z., Deng,T., Jones,R., Li,H., Herschkowitz,J.I., Liu,J.C., Weigman,V.J., Tsao,M.S., Lane,T.F., Perou,C.M., & Zacksenhaus,E. (2010) Rb deletion in mouse mammary progenitors induces luminal-B or basal-like/EMT tumor subtypes depending on p53 status. *J.Clin Invest*, **120**, 3296-3309.
- Jiang,Z., Jones,R., Liu,J.C., Deng,T., Robinson,T., Chung,P.E., Wang,S., Herschkowitz,J.I., Egan,S.E., Perou,C.M., & Zacksenhaus,E. (2011) RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple-negative breast cancer. *Cell Cycle*, **10**, 1563-1570.
- Jonsson,G., Staaf,J., Vallon-Christersson,J., Ringner,M., Holm,K., Hegardt,C., Gunnarsson,H., Fagerholm,R., Strand,C., Agnarsson,B.A., Kilpivaara,O., Luts,L., Heikkila,P., Aittomaki,K., Blomqvist,C., Loman,N., Malmstrom,P., Olsson,H., Johannsson,O.T., Arason,A., Nevanlinna,H., Barkardottir,R.B., & Borg,A. (2010) Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics. *Breast Cancer Res.*, **12**, R42.
- Jorge,D., Lara,C., & Ortiz,C. (2007) Basic immunohistochemical interpretation. General features and celular localization of diverse antibodies. *Patología Revista Latinoamericana*, **45**, 126-140.
- Joshi,J.P., Brown,N.E., Griner,S.E., & Nahta,R. (2011) Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2 phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Biochem.Pharmacol.*, **82**, 1090-1099.
- Kariagina,A., Xie,J., Langohr,I.M., Opreanu,R.C., Basson,M.D., & Haslam,S.Z. (2013) Progesterone Stimulates Proliferation and Promotes Cytoplasmic Localization of the Cell Cycle Inhibitor p27 in Steroid Receptor Positive Breast Cancers. *Horm.Cancer*.
- Katayama,H., Brinkley,W.R., & Sen,S. (2003) The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev*, **22**, 451-464.
- Katayama,H., Sasai,K., Kawai,H., Yuan,Z.M., Bondaruk,J., Suzuki,F., Fujii,S., Arlinghaus,R.B., Czerniak,B.A., & Sen,S. (2004) Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat.Genet.*, **36**, 55-62.
- Kim,H.S., Park,I., Cho,H.J., Gwak,G., Yang,K., Bae,B.N., Kim,K.W., Han,S., Kim,H.J., & Kim,Y.D. (2012) Analysis of the potent prognostic factors in luminal-type breast cancer. *J Breast Cancer*, **4**, 401-406.

- Kobayashi,T., Iwaya,K., Moriya,T., Yamasaki,T., Tsuda,H., Yamamoto,J., & Matsubara,O. (2013) A simple immunohistochemical panel comprising 2 conventional markers, Ki67 and p53, is a powerful tool for predicting patient outcome in luminal-type breast cancer. *BMC.Clin Pathol.*, **13**, 5.
- Koker,M.M. & Kleer,C.G. (2004) p63 expression in breast cancer: a highly sensitive and specific marker of metaplastic carcinoma. *Am.J.Surg.Pathol.*, **28**, 1506-1512.
- Korsching,E., Jeffrey,S.S., Meinerz,W., Decker,T., Boecker,W., & Buerger,H. (2008) Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. *J.Clin.Pathol.*, **61**, 553-560.
- Kroger,N., Milde-Langosch,K., Riethdorf,S., Schmoor,C., Schumacher,M., Zander,A.R., & Loning,T. (2006) Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clin.Cancer Res.*, **12**, 159-168.
- Kumar,P., Mukherjee,M., Johnson,J.P., Patel,M., Huey,B., Albertson,D.G., & Simin,K. (2012) Cooperativity of Rb, Brca1, and p53 in malignant breast cancer evolution. *PLoS.Genet.*, **8**, e1003027.
- Kumar,V., Abbas,A.K., Fausto,N., & Aster,J. (2009) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th ed. edn, Saunders.
- Labrie,F. (2007) Drug insight: breast cancer prevention and tissue-targeted hormone replacement therapy. *Nat.Clin.Pract.Endocrinol.Metab*, **3**, 584-593.
- Lakhani,S.R., Ellis,I.O., Schnitt,S.J., Tan,P.H., & van,d., V (2012) *WHO Classification of tumors of the breast*, 4th edn, International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Langner,C., von,W.R., Ratschek,M., Rehak,P., & Zigeuner,R. (2004) Expression of p27 and its ubiquitin ligase subunit Skp2 in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology*, **64**, 611-616.
- Larsen,P.B., Kumler,I., & Nielsen,D.L. (2013) A systematic review of trastuzumab and lapatinib in the treatment of women with brain metastases from HER2-positive breast cancer. *Cancer Treat.Rev*, **39**, 720-727.
- Leclere,B., Molinie,F., Tretarre,B., Stracci,F., Daubisse-Marliac,L., & Colonna,M. (2013) Trends in incidence of breast cancer among women under 40 in seven European countries: a GRELL cooperative study. *Cancer Epidemiol.*, **37**, 544-549.
- Lee,J.J., Ko,E., Cho,J., Park,H.Y., Lee,J.E., Nam,S.J., Kim,D.H., & Cho,E.Y. (2012) Methylation and Immunoexpression of p16(INK4a) Tumor Suppressor Gene in Primary Breast Cancer Tissue and Their Quantitative p16(INK4a) Hypermethylation in Plasma by Real-Time PCR. *Korean J.Pathol.*, **46**, 554-561.

- Lehn,S., Ferno,M., Jirstrom,K., Ryden,L., & Landberg,G. (2011) A non-functional retinoblastoma tumor suppressor (RB) pathway in premenopausal breast cancer is associated with resistance to tamoxifen. *Cell Cycle*, **10**, 956-962.
- Lerma,E., Barnadas,A., & Prat,J. (2009) Triple negative breast carcinomas: similarities and differences with basal like carcinomas. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.*, **17**, 483-494.
- Lester,S.C., Bose,S., Chen,Y.Y., Connolly,J.L., de Baca,M.E., Fitzgibbons,P.L., Hayes,D.F., Klee,C., O'Malley,F.P., Page,D.L., Smith,B.L., Tan,L.K., Weaver,D.L., & Winer,E. (2009) Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch.Pathol.Lab Med.*, **133**, 1515-1538.
- Lewis,G.H., Subhawong,A.P., Nassar,H., Vang,R., Illei,P.B., Park,B.H., & Argani,P. (2011) Relationship between molecular subtype of invasive breast carcinoma and expression of gross cystic disease fluid protein 15 and mammaglobin. *Am.J.Clin Pathol.*, **135**, 587-591.
- Lin,H.M., Zhao,L., & Cheng,S.Y. (2002) Cyclin D1 Is a Ligand-independent Co-repressor for Thyroid Hormone Receptors. *J.Biol.Chem.*, **277**, 28733-28741.
- Liu,H., Shi,J., Wilkerson,M.L., & Lin,F. (2012) Immunohistochemical evaluation of GATA3 expression in tumors and normal tissues: a useful immunomarker for breast and urothelial carcinomas. *Am.J.Clin.Pathol.*, **138**, 57-64.
- Liu,Q., Kaneko,S., Yang,L., Feldman,R.I., Nicosia,S.V., Chen,J., & Cheng,J.Q. (2004) Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *J.Biol.Chem.*, **279**, 52175-52182.
- Loi,S., Haibe-Kains,B., Desmedt,C., Lallemand,F., Tutt,A.M., Gillet,C., Ellis,P., Harris,A., Bergh,J., Foekens,J.A., Klijn,J.G., Larsimont,D., Buyse,M., Bontempi,G., Delorenzi,M., Piccart,M.J., & Sotiriou,C. (2007) Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J.Clin.Oncol.*, **25**, 1239-1246.
- Luo,M.H., Huang,Y.H., Ni,Y.B., Tsang,J.Y., Chan,S.K., Shao,M.M., & Tse,G.M. (2013) Expression of mammaglobin and gross cystic disease fluid protein-15 in breast carcinomas. *Hum.Pathol.*, **44**, 1241-1250.
- Malvezzi,M., Bertuccio,P., Levi,F., La,V.C., & Negri,E. (2013) European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann.Oncol.*, **24**, 792-800.
- Mao,J.H., Wu,D., Perez-Losada,J., Jiang,T., Li,Q., Neve,R.M., Gray,J.W., Cai,W.W., & Balmain,A. (2007) Crosstalk between Aurora-A and p53: frequent deletion or downregulation of Aurora-A in tumors from p53 null mice. *Cancer Cell*, **11**, 161-173.
- Marquez,D.C. (2002) Receptor de Estrógeno: Bases Moleculares Aplicadas a Medicina. *VITAE.Academia Biomedica Digital.*, **10**.

- Martinez,J.C.; Piris,M.A.; Sanchez-Beato,M.; Villuendas,R.; Orradre,J.L.; Algara,P.; Sanchez-Verde,L.; & Martinez,P. (1993) Retinoblastoma (Rb) gene product expression in lymphomas. Correlation with Ki67 growth fraction. *J. Pathol.*, **169**, 405-412.
- Martinez,J.C.; Mateo,M.; Sanchez-Beato,M.; Villuendas,R.; Orradre,J.L.; Algara,P.; Sanchez-Verde,L.; Garcia,P.; Lopez,C.; & Martinez,P. (1995) MDM2 expression in lymphoid cells and reactive and neoplastic lymphoid tissue. Comparative study with p53 expression. *J. Pathol.*, **177**, 27-34.
- Mazoujian,G., Bodian,C., Haagensen,D.E., Jr., & Haagensen,C.D. (1989) Expression of GCDFP-15 in breast carcinomas. Relationship to pathologic and clinical factors. *Cancer*, **63**, 2156-2161.
- Mehra,R., Varambally,S., Ding,L., Shen,R., Sabel,M.S., Ghosh,D., Chinnaiyan,A.M., & Kleer,C.G. (2005) Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis. *Cancer Res.*, **65**, 11259-11264.
- Mehta,R.J., Jain,R.K., Leung,S., Choo,J., Nielsen,T., Huntsman,D., Nakshatri,H., & Badve,S. (2012) FOXA1 is an independent prognostic marker for ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.*, **131**, 881-890.
- Meraldi,P., Honda,R., & Nigg,E.A. (2004) Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **14**, 29-36.
- Milde-Langosch,K., Bamberger,A.M., Rieck,G., Kelp,B., & Loning,T. (2001) Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype. *Breast Cancer Res.Treat.*, **67**, 61-70.
- Millar,E.K., Graham,P.H., McNeil,C.M., Browne,L., O'Toole,S.A., Boulghourjian,A., Kearsley,J.H., Papadatos,G., Delaney,G., Fox,C., Nasser,E., Capp,A., & Sutherland,R.L. (2011) Prediction of outcome of early ER+ breast cancer is improved using a biomarker panel, which includes Ki-67 and p53. *Br.J.Cancer*, **105**, 272-280.
- Miller,W.R., Shivas,A.A., Franchimont,P., & Haagensen,D.E. (1988) Breast gross cystic disease protein 15 in human breast cancer in culture. *Eur.J.Cancer Clin Oncol*, **24**, 223-228.
- Mimeault M., Johansson S.L, & Batra S.K. (2013) Marked improvement of cytotoxic effects induced by docetaxel on highly metastatic and androgen-independent prostate cancer cells by downregulating macrophage inhibitory cytokine-1. *Br J Cancer*, **108**, 1079-1091.
- Miyai,K., Yamamoto,S., Iwaya,K., Asano,T., Tamai,S., Tsuda,H., & Matsubara,O. (2012) Altered expression of p27(Kip1) -interacting cell-cycle regulators in the adult testicular germ cell tumors: potential role in tumor development and histological progression. *APMIS*, **120**, 890-900.

- Miyoshi,Y., Iwao,K., Egawa,C., & Noguchi,S. (2001) Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int.J.Cancer*, **92**, 370-373.
- Mohsin,S.K. Frozen Section Library: Breast. (2012). Springer Science + Business Media.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Moo,T.A, McMillan,R., Lee,M., Stempel,M., Ho,A., Patil,S., & El-Tamer,M. (2014) Impact of Molecular Subtype on Locoregional Recurrence in Mastectomy Patients with T1-T2 Breast Cancer and 1-3 Positive Lymph Nodes. *Ann Surg Oncol*. **21**:86-92.
- Mote,P.A., Graham,J.D., & Clarke,C.L. (2007) Progesterone receptor isoforms in normal and malignant breast. *Ernst.Schering.Found.Symp.Proc.*, 77-107.
- Mu,K., Li,L., Yang,Q., Zhang,T., Gao,P., Meng,B., Liu,Z., Wang,Y., & Zhou,G. (2011) Detection of CHK1 and CCND1 gene copy number changes in breast cancer with dual-colour fluorescence in-situ hybridization. *Histopathology*, **58**, 601-607.
- Munirah,M.A., Siti-Aishah,M.A., Reena,M.Z., Sharifah,N.A., Rohaizak,M., Norlia,A., Rafie,M.K., Asmiati,A., Hisham,A., Fuad,I., Shahrin,N.S., & Das,S. (2011) Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. *Rom.J.Morphol.Embryol.*, **52**, 669-677.
- Mylona,E., Tzelepis,K., Theohari,I., Giannopoulou,I., Papadimitriou,C., & Nakopoulou,L. (2013) Cyclin D1 in invasive breast carcinoma: favourable prognostic significance in unselected patients and within subgroups with an aggressive phenotype. *Histopathology*, **62**, 472-480.
- Naderi,A., Meyer,M., & Dowhan,D.H. (2012) Cross-regulation between FOXA1 and ErbB2 signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Neoplasia.*, **14**, 283-296.
- Nickel,N., Jonigk,D., Kempf,T., Bockmeyer,C.L., Maegel,L., Rische,J., Laenger,F., Lehmann,U., Sauer,C., Greer,M., Welte,T., Hoeper,M.M., & Golpon,H.A. (2011) GDF-15 is abundantly expressed in plexiform lesions in patients with pulmonary arterial hypertension and affects proliferation and apoptosis of pulmonary endothelial cells. *Respir.Res.*, **12**, 62.
- Noriega-Reyes,M.Y. & Langley,E. (2008) Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología*, **3**, 29-40.
- Ozcelik,H., Mousses,S., & Andrulis,I.L. (1995) Low levels of expression of an inhibitor of cyclin-dependent kinases (CIP1/WAF1) in primary breast carcinomas with p53 mutations. *Clin.Cancer Res.*, **1**, 907-912.
- Pappo,I., Karni,T., Sandbank,J., Dinur,I., Sella,A., Stahl-Kent,V., Wasserman,I., & Halevy,A. (2007) Breast cancer in the elderly: histological, hormonal and surgical characteristics. *Breast*, **16**, 60-67.

- Park,K., Han,S., Kim,H.J., Kim,J., & Shin,E. (2006) HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology*, **48**, 702-707.
- Park,S., Koo,J., Park,H.S., Kim,J.H., Choi,S.Y., Lee,J.H., Park,B.W., & Lee,K.S. (2010) Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Ann.Oncol.*, **21**, 488-492.
- Park,S., Koo,J.S., Kim,M.S., Park,H.S., Lee,J.S., Lee,J.S., Kim,S.I., Park,B.W., & Lee,K.S. (2011) Androgen receptor expression is significantly associated with better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancers. *Ann.Oncol.*, **22**, 1755-1762.
- Park,S.Y., Kim,B.H., Kim,J.H., Lee,S., & Kang,G.H. (2007) Panels of immunohistochemical markers help determine primary sites of metastatic adenocarcinoma. *Arch.Pathol.Lab Med.*, **131**, 1561-1567.
- Parker,J.S., Mullins,M., Cheang,M.C., Leung,S., Voduc,D., Vickery,T., Davies,S., Fauron,C., He,X., Hu,Z., Quackenbush,J.F., Stijleman,I.J., Palazzo,J., Marron,J.S., Nobel,A.B., Mardis,E., Nielsen,T.O., Ellis,M.J., Perou,C.M., & Bernard,P.S. (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J.Clin.Oncol.*, **27**, 1160-1167.
- Parl,F.F., & Dupont,W.D. (1982) A retrospective cohort study of Histologic risk factors in breast cancer patients. *Cancer*, **50**, 2410-2416
- Patani,N., Martin,L.A., & Dowsett,M. (2013) Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective. *Int.J.Cancer*, **133**, 1-13.
- Payne,S.J., Bowen,R.L., Jones,J.L., & Wells,C.A. (2008) Predictive markers in breast cancer--the present. *Histopathology*, **52**, 82-90.
- Pellikainen,M.J., Pekola,T.T., Ropponen,K.M., Kataja,V.V., Kellokoski,J.K., Eskelinen,M.J., & Kosma,V.M. (2003) p21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis. *J.Clin Pathol.*, **56**, 214-220.
- Perou,C.M., Jeffrey,S.S., van de Rijn,M., Rees,C.A., Eisen,M.B., Ross,D.T., Pergamenschikov,A., Williams,C.F., Zhu,S.X., Lee,J.C., Lashkari,D., Shalon,D., Brown,P.O., & Botstein,D. (1999) Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 9212-9217.
- Perou,C.M., Sorlie,T., Eisen,M.B., van de Rijn,M., Jeffrey,S.S., Rees,C.A., Pollack,J.R., Ross,D.T., Johnsen,H., Akslen,L.A., Fluge,O., Pergamenschikov,A., Williams,C., Zhu,S.X., Lonning,P.E., Borresen-Dale,A.L., Brown,P.O., & Botstein,D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **406**, 747-752.
- Peters,A.A., Buchanan,G., Ricciardelli,C., Bianco-Miotto,T., Centenera,M.M., Harris,J.M., Jindal,S., Segara,D., Jia,L., Moore,N.L., Henshall,S.M.,

- Birrell,S.N., Coetzee,G.A., Sutherland,R.L., Butler,L.M., & Tilley,W.D. (2009) Androgen receptor inhibits estrogen receptor-alpha activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res.*, **69**, 6131-6140.
- Peurala,E., Koivunen,P., Haapasaari,K.M., Bloigu,R., & Jukkola-Vuorinen,A. (2013) The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **15**, R5.
- Pillay,K., McCleod,H., Chetty,R., & Hall,P. (2011) A study to investigate the role of p27 and cyclin E immunoexpression as a prognostic factor in early breast carcinoma. *World J.Surg.Oncol.*, **9**, 31.
- Rakha,E.A., Reis-Filho,J.S., Baehner,F., Dabbs,D.J., Decker,T., Eusebi,V., Fox,S.B., Ichihara,S., Jacquemier,J., Lakhani,S.R., Palacios,J., Richardson,A.L., Schnitt,S.J., Schmitt,F.C., Tan,P.H., Tse,G.M., Badve,S., & Ellis,I.O. (2010a) Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.*, **12**, 207.
- Rakha,E.A., Reis-Filho,J.S., & Ellis,I.O. (2010b) Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.*, **120**, 293-308.
- Rakha,E.A., van Deurzen,C.H., Paish,E.C., Macmillan,R.D., Ellis,I.O., & Lee,A.H. (2013) Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: is it a prognostically significant pathological subtype independent of histological grade? *Mod.Pathol.*, **26**, 496-501.
- Reis-Filho,J.S., Savage,K., Lambros,M.B., James,M., Steele,D., Jones,R.L., & Dowsett,M. (2006) Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis. *Mod.Pathol.*, **19**, 999-1009.
- Reigosa,A., Fernandez, A., Gutierrez,D., Caleiras,E., Hardisson,D., Espig,H., Saldivia,F., Juarranz,A., & Sanz,F. (2010). Expresión de p63 y citoqueratina 5/6 en los diferentes tipos moleculares del carcinoma de mama. *Revista Española de Patología*, **43**,79-85.
- Robinson,J.L., Holmes,K.A., & Carroll,J.S. (2013) FOXA1 mutations in hormone-dependent cancers. *Front Oncol*, **3**, 20.
- Robinson,J.L., Macarthur,S., Ross-Innes,C.S., Tilley,W.D., Neal,D.E., Mills,I.G., & Carroll,J.S. (2011) Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1. *EMBO J.*, **30**, 3019-3027.
- Rosen P. Rosen's Breast Pathology, 3rd edition. 2009. Lippincott Williams & Wilkins. Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Rossner,P., Jr., Gammon,M.D., Zhang,Y.J., Terry,M.B., Hibshoosh,H., Memeo,L., Mansukhani,M., Long,C.M., Garbowski,G., Agrawal,M., Kalra,T.S., Gaudet,M.M., Teitelbaum,S.L., Neugut,A.I., & Santella,R.M. (2009) Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. *J.Cell Mol.Med.*, **13**, 3847-3857.

- Roth,P., Junker,M., Tritschler,I., Mittelbronn,M., Dombrowski,Y., Breit,S.N., Tabatabai,G., Wick,W., Weller,M., & Wischhusen,J. (2010) GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas. *Clin Cancer Res.*, **16**, 3851-3859.
- Roy,P.G., Pratt,N., Purdie,C.A., Baker,L., Ashfield,A., Quinlan,P., & Thompson,A.M. (2010) High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer. *Int.J.Cancer*, **127**, 355-360.
- Roy,P.G. & Thompson,A.M. (2006) Cyclin D1 and breast cancer. *Breast*, **15**, 718-727.
- Royce,M.E., Xia,W., Sahin,A.A., Katayama,H., Johnston,D.A., Hortobagyi,G., Sen,S., & Hung,M.C. (2004) STK15/Aurora-A expression in primary breast tumors is correlated with nuclear grade but not with prognosis. *Cancer*, **100**, 12-19.
- Sant,M., Capocaccia,R., Verdecchia,A., Esteve,J., Gatta,G., Micheli,A., Coleman,M.P., & Berrino,F. (1998) Survival of women with breast cancer in Europe: variation with age, year of diagnosis and country. The EURO CARE Working Group. *Int.J.Cancer*, **77**, 679-683.
- Scholzen,T. & Gerdes,J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J.Cell Physiol*, **182**, 311-322.
- Sen,S., Zhou,H., & White,R.A. (1997) A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, **14**, 2195-2200.
- Shan, L, Li, X., Liu, L., Ding, X., Wang, Q., Zheng, Y., Duan, Y., Xuan, C., Wang, Y., Yang, F., Shang, Y., & Shi L. (2013) GATA3 cooperates with PARP1 to regulate CCND1 transcription through modulating histone H1 incorporation. *Oncogene*.
- Shan,M., Zhang,X., Liu,X., Qin,Y., Liu,T., Liu,Y., Wang,J., Zhong,Z., Zhang,Y., Geng,J., & Pang,D. (2013) P16 and p53 play distinct roles in different subtypes of breast cancer. *PLoS.One.*, **8**, e76408.
- Shekhar,M.P., Kato,I., Nangia-Makker,P., & Tait,L. (2013) Comedo-DCIS is a precursor lesion for basal-like breast carcinoma: identification of a novel p63/Her2/neu expressing subgroup. *Oncotarget.*, **4**, 231-241.
- Siggelkow,W., Boehm,D., Gebhard,S., Battista,M., Sicking,I., Lebrecht,A., Solbach,C., Hellwig,B., Rahnenfuhrer,J., Koelbl,H., Gehrmann,M., Marchan,R., Cadenas,C., Hengstler,J.G., & Schmidt,M. (2012) Expression of aurora kinase A is associated with metastasis-free survival in node-negative breast cancer patients. *BMC.Cancer*, **12**, 562.
- Silva,J., Silva,J.M., Dominguez,G., Garcia,J.M., Cantos,B., Rodriguez,R., Larrondo,F.J., Provencio,M., Espana,P., & Bonilla,F. (2003) Concomitant expression of p16INK4a and p14ARF in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms. *J.Pathol.*, **199**, 289-297.

- Sircoulomb,F., Bekhouche,I., Finetti,P., Adelaide,J., Ben,H.A., Bonansea,J., Raynaud,S., Innocenti,C., Charafe-Jauffret,E., Tarpin,C., Ben,A.F., Viens,P., Jacquemier,J., Bertucci,F., Birnbaum,D., & Chaffanet,M. (2010) Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers. *BMC.Cancer*, **10**, 539.
- Siziopikou,K.P. (2013) Ductal carcinoma in situ of the breast: current concepts and future directions. *Arch.Pathol.Lab Med.*, **137**, 462-466.
- Sommer,S. & Fuqua,S.A. (2001) Estrogen receptor and breast cancer. *Semin.Cancer Biol.*, **11**, 339-352.
- Sorlie,T., Perou,C.M., Tibshirani,R., Aas,T., Geisler,S., Johnsen,H., Hastie,T., Eisen,M.B., van de Rijn,M., Jeffrey,S.S., Thorsen,T., Quist,H., Matese,J.C., Brown,P.O., Botstein,D., Lonning,P.E., & Borresen-Dale,A.L. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 10869-10874.
- Sosinska-Mielcarek,K., Duchnowska,R., Winczura,P., Badzio,A., Majewska,H., Lakomy,J., Peksa,R., Pieczynska,B., Radecka,B., Debska,S., Biernat,W., & Jassem,J. (2013) Immunohistochemical prediction of brain metastases in patients with advanced breast cancer: The role of Rad51. *Breast*.
- Sotiriou,C.; Neo,S.Y.; McShane,L.M.; Korn,E.L.; Long,P.M.; Jazaeri,A.; Martiat,P.; Fox,S.B.; Harris,A.L.; & Liu,E.T. (2003) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **100**, 10393-10398.
- Sousa,B., Paredes,J., Milanezi,F., Lopes,N., Martins,D., Dufloth,R., Vieira,D., Albergaria,A., Veronese,L., Carneiro,V., Carvalho,S., Costa,J.L., Zeferino,L., & Schmitt,F. (2010) P-cadherin, vimentin and CK14 for identification of basal-like phenotype in breast carcinomas: an immunohistochemical study. *Histol.Histopathol.*, **25**, 963-974.
- Staff,S., Isola,J., Jumppanen,M., & Tanner,M. (2010) Aurora-A gene is frequently amplified in basal-like breast cancer. *Oncol Rep.*, **23**, 307-312.
- Strelau,J., Schmeer,C., Peterziel,H., Sackmann,T., Herold-Mende,C., Steiner,H., Weller,M., & Unsicker,K. (2008) Expression and putative functions of GDF-15, a member of the TGF-beta superfamily, in human glioma and glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.*, **270**, 30-39.
- Subhawong,A.P., Subhawong,T., Nassar,H., Kouprina,N., Begum,S., Vang,R., Westra,W.H., & Argani,P. (2009) Most basal-like breast carcinomas demonstrate the same Rb-/p16+ immunophenotype as the HPV-related poorly differentiated squamous cell carcinomas which they resemble morphologically. *Am.J.Surg.Pathol.*, **33**, 163-175.
- Subik,K., Lee,J.F., Baxter,L., Strzepek,T., Costello,D., Crowley,P., Xing,L., Hung,M.C., Bonfiglio,T., Hicks,D.G., & Tang,P. (2010) The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl.)*, **4**, 35-41.

- Tanaka,T., Kimura,M., Matsunaga,K., Fukada,D., Mori,H., & Okano,Y. (1999) Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res.*, **59**, 2041-2044.
- Tang,P., Skinner,K.A., & Hicks,D.G. (2009) Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready? *Diagn.Mol.Pathol.*, **18**, 125-132.
- Tang,L., Wang,Y., Strom,A., Gustafsson,J.A., & Guan,X. (2013) Lapatinib induces p27(Kip1)-dependent G(1) arrest through both transcriptional and post-translational mechanisms. *Cell Cycle*, **12**, 2665-2674.
- Thomadaki,H., Talieri,M., & Scorilas,A. (2007) Prognostic value of the apoptosis related genes BCL2 and BCL2L12 in breast cancer. *Cancer Lett.*, **247**, 48-55.
- Thorat,M.A., Marchio,C., Morimiya,A., Savage,K., Nakshatri,H., Reis-Filho,J.S., & Badve,S. (2008) Forkhead box A1 expression in breast cancer is associated with luminal subtype and good prognosis. *J.Clin.Pathol.*, **61**, 327-332.
- Tobin,N.P. & Bergh,J. (2012) Analysis of Cyclin D1 in Breast Cancer: A Call to Arms. *Curr.Breast Cancer Rep.*, **4**, 171-173.
- Traina,A., Agostara,B., Marasa,L., Calabro,M., Zarcone,M., & Carruba,G. (2006) HER2/neu expression in relation to clinicopathologic features of breast cancer patients. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **1089**, 159-167.
- Turashvili,G., McKinney,S.E., Goktepe,O., Leung,S.C., Huntsman,D.G., Gelmon,K.A., Los,G., Rejto,P.A., & Aparicio,S.A. (2011) P-cadherin expression as a prognostic biomarker in a 3992 case tissue microarray series of breast cancer. *Mod.Pathol.*, **24**, 64-81.
- Uribe,J.R., Hernández,C.A., Menolascino,F., & Rodriguez,J.E. (2010) Clasificación Molecular del Cáncer de Mama y su correlación clínica. *Rev Venez Oncol*, **22**, 109-116.
- van de Vijver,M.J., He,Y.D., van't Veer,L.J., Dai,H., Hart,A.A., Voskuil,D.W., Schreiber,G.J., Peterse,J.L., Roberts,C., Marton,M.J., Parrish,M., Atsma,D., Witteveen,A., Glas,A., Delahaye,L., van,d., V, Bartelink,H., Rodenhuis,S., Rutgers,E.T., Friend,S.H., & Bernards,R. (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N.Engl.J.Med.*, **347**, 1999-2009.
- Vendrell,J.A., Robertson,K.E., Ravel,P., Bray,S.E., Bajard,A., Purdie,C.A., Nguyen,C., Hadad,S.M., Bieche,I., Chabaud,S., Bachelot,T., Thompson,A.M., & Cohen,P.A. (2008) A candidate molecular signature associated with tamoxifen failure in primary breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **10**, R88.
- Viacava,P., Naccarato,A.G., & Bevilacqua,G. (1998) Spectrum of GCDFP-15 expression in human fetal and adult normal tissues. *Virchows Arch.*, **432**, 255-260.
- Vilardell,F., Novell,A., Martin,J., Santacana,M., Velasco,A., Diez-Castro,M.J., Cuevas,D., Panades,M.J., Gonzalez,S., Llombart,A., Iglesias,E., & Matias-

- Guiu,X. (2012) Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA. *Virchows Arch.*, **460**, 569-575.
- Villaroel,J., Ortiz,C., & Soria,D. (2012) Comparación inmunohistoquímica entre la GCDFP-15 y los receptores para estrógenos y progesterona en el diagnóstico de carcinoma metastásico de la mama. *Gaceta Médica de Mexico*, **148**, 213-17.
- Voduc,D., Cheang,M., & Nielsen,T. (2008) GATA-3 expression in breast cancer has a strong association with estrogen receptor but lacks independent prognostic value. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, **17**, 365-373.
- Wallin,U., Glimelius,B., Jirstrom,K., Darmanis,S., Nong,R.Y., Ponten,F., Johansson,C., Pahlman,L., & Birgisson,H. (2011) Growth differentiation factor 15: a prognostic marker for recurrence in colorectal cancer. *Br.J.Cancer*, **104**, 1619-1627.
- Wang,Y., Klijn,J.G., Zhang,Y., Sieuwerts,A.M., Look,M.P., Yang,F., Talantov,D., Timmermans,M., Meijer-van Gelder,M.E., Yu,J., Jatkoa,T., Berns,E.M., Atkins,D., & Foekens,J.A. (2005) Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*, **365**, 671-679.
- Weikel,W., Beck,T., Mitze,M., & Knapstein,P.G. (1991) Immunohistochemical evaluation of growth fractions in human breast cancers using monoclonal antibody Ki-67. *Breast Cancer Res.Treat.*, **18**, 149-154.
- Weigel,M.T. & Dowsett,M. (2010) Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr.Relat Cancer*, **17**, R245-R262.
- Weigelt,B., Baehner,F.L., & Reis-Filho,J.S. (2010a) The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J.Pathol.*, **220**, 263-280.
- Weigelt,B., Geyer,F.C., & Reis-Filho,J.S. (2010b) Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol.Oncol.*, **4**, 192-208.
- Wen,D.X., Xu,Y.F., Mais,D.E., Goldman,M.E., & McDonnell,D.P. (1994) The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol.Cell Biol.*, **14**, 8356-8364.
- Wick,M.R., Lillemoe,T.J., Copland,G.T., Swanson,P.E., Manivel,J.C., & Kiang,D.T. (1989) Gross cystic disease fluid protein-15 as a marker for breast cancer: immunohistochemical analysis of 690 human neoplasms and comparison with alpha-lactalbumin. *Hum.Pathol.*, **20**, 281-287.
- Wilson,C.M. & McPhaul,M.J. (1994) A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 1234-1238.
- Wintzer,H.O., Zipfel,I., Schulte-Monting,J., Hellerich,U., & von,K.S. (1991) Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer*, **67**, 421-428.

- Wolf, I., Bose, S., Williamson, E.A., Miller, C.W., Karlan, B.Y., & Koeffler, H.P. (2007) FOXA1: Growth inhibitor and a favorable prognostic factor in human breast cancer. *Int.J.Cancer*, **120**, 1013-1022.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E., Hicks, D.G., Dowsett, M., McShane, L.M., Allison, K.H., Allred, D.C., Bartlett, J.M., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R.B., Mangu, P.B., Paik, S., Perez, E.A., Press, M.F., Spears, P.A., Vance, G.H., Viale, G., & Hayes, D.F. (2013) Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J.Clin.Oncol.*
- Wolff, A.C., Hammond, M.E., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., McShane, L.M., Paik, S., Pegram, M.D., Perez, E.A., Press, M.F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S.E., Tubbs, R., Vance, G.H., van, d., V, Wheeler, T.M., & Hayes, D.F. (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J.Clin.Oncol.*, **25**, 118-145.
- Yamaguchi, N., Ito, E., Azuma, S., Honma, R., Yanagisawa, Y., Nishikawa, A., Kawamura, M., Imai, J., Tatsuta, K., Inoue, J., Semba, K., & Watanabe, S. (2008) FoxA1 as a lineage-specific oncogene in luminal type breast cancer. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **365**, 711-717.
- Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P.M., Hayes, M.M., & Gelmon, K.A. (2010) Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.*, **11**, 174-183.
- Yoon, N.K., Maresh, E.L., Shen, D., Elshimali, Y., Apple, S., Horvath, S., Mah, V., Bose, S., Chia, D., Chang, H.R., & Goodglick, L. (2010) Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum.Pathol.*, **41**, 1794-1801.
- Zepeda-Castilla, E.J., Recinos-Money, E., Cuellar-Hubbe, M., Robles-Vidal, C.D., & Maafs-Molina, E. (2008) [Molecular classification of breast cancer]. *Cir.Cir.*, **76**, 87-93.
- Zhang, D., Tari, A.M., Akar, U., Arun, B.K., LaFortune, T.A., Nieves-Alicea, R., Hortobagyi, G.N., & Ueno, N.T. (2010) Silencing kinase-interacting stathmin gene enhances erlotinib sensitivity by inhibiting Ser(1)(0) p27 phosphorylation in epidermal growth factor receptor-expressing breast cancer. *Mol.Cancer Ther.*, **9**, 3090-3099.